

# **Methanoloxidation in oxischen Böden und Umweltparameter assoziierter methyлотropher Mikroorganismen- Gemeinschaften**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.  
der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften  
der Universität Bayreuth

vorgelegt von  
Astrid Stacheter

Bayreuth, Juni 2013



Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2008 bis Juni 2013 am Lehrstuhl Ökologische Mikrobiologie (Universität Bayreuth) unter der Anleitung von PD Dr. Steffen Kolb angefertigt.

Die Arbeit wurde aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Fördernummer: DFG Dr310/5-1) und der Universität Bayreuth finanziert.

**Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden als Artikel in einer wissenschaftlichen Zeitschrift veröffentlicht:**

**Stacheter, A.**, Noll, M., Lee, C. K., Selzer, M., Glowik, B., Ebertsch, L., Mertel, R., Schulz, D., Lampert, N., Drake, H. L., Kolb, S. (2012) Methanol oxidation by temperate soils and environmental determinants of associated methylophs. ISME J. Online verfügbar. doi: 10.1038/ismej.2012.167.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 04.06.2013

Zulassung durch die Prüfungskommission: 12.06.2013

Wissenschaftliches Kolloquium: 09.12.2013

Amtierender Dekan:

Prof. Dr. Rhett Kempe

Prüfungsausschuss:

PD Dr. Steffen Kolb (Erstgutachter)

Prof. Dr. Ortwin Meyer (Zweitgutachter)

Prof. Dr. Bettina Engelbrecht (Vorsitz)

Prof. Dr. Heike Feldhaar

PD Dr. Werner Borken



## INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	V
TABELLENVERZEICHNIS .....	VII
VERZEICHNIS DER GLEICHUNGEN .....	X
VERZEICHNIS DER BEISPIELRECHNUNGEN .....	X
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	XI
1 EINLEITUNG .....	1
1.1 Die „Virtuosität“ der Methyлотроphen .....	1
1.2 Die Bedeutung von Methanol für die globale Atmosphärenchemie .....	2
1.3 Der globale Methanolhaushalt .....	4
1.4 Methanoloхidation im Boden .....	7
1.5 Die Vielfalt der Methyлотроphen .....	9
1.6 Methanol-abhängiger Metabolismus methyлотроpher <i>Bacteria</i> .....	14
1.6.1 Oxidation von Methanol zu Formaldehyd .....	15
1.6.2 Oxidation von Formaldehyd zu CO <sub>2</sub> .....	16
1.6.3 Kohlenstoffassimilation .....	19
1.7 Ökologische Nischen methyлотроpher Prokaryoten .....	19
1.7.1 Substrate .....	20
1.7.2 Sauerstoff .....	21
1.7.3 Stickstoff .....	21
1.7.4 pH-Wert .....	22
1.7.5 Temperatur .....	23
1.7.6 Salzkonzentration .....	23
1.7.7 Prädatoren .....	24
1.7.8 Vegetationstyp und Landnutzung .....	24
1.8 Funktionelle Genmarker der Methyлотроphen .....	25
1.9 Ziele und Hypothesen .....	28
2 MATERIAL UND METHODEN .....	29
2.1 Standortbeschreibung .....	29
2.2 Probenahme .....	32
2.3 Bestimmen von Bodenparametern .....	33
2.4 Verwendete Chemikalien und Gase .....	34
2.5 Sterilisation .....	34

2.6 Methanoloxidation .....	34
2.6.1 Messung der Oxidation von Methanol zu CO <sub>2</sub> .....	34
2.6.2 Methanoloxidation in Bodenaufschlämmungen und durch Pflanzenmaterial .....	37
2.6.3 Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	37
2.6.4 Apparente Michaelis-Menten-Kinetiken .....	39
2.6.5 Wiederfindung der Radioaktivität .....	41
2.7 Kultivierung von Isolaten und Bestimmung der Zellzahlen .....	42
2.7.1 Kultivierungsmedien .....	42
2.7.2 Isolierung von Reinkulturen .....	46
2.7.3 Bestimmung der Zellzahlen mittels MPN-Methode .....	46
2.8 Molekularbiologische Methoden .....	48
2.8.1 DNA-Extraktion nach Stralis-Pavese .....	49
2.8.2 Nukleinsäure-Extraktion nach Griffiths .....	50
2.8.3 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration .....	52
2.8.3.1 Fluoreszenzbasierte Bestimmung der DNA-Konzentration .....	52
2.8.3.2 Spektrophotometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration .....	52
2.8.4 Polymerase-Kettenreaktion .....	52
2.8.4.1 PCR-Protokolle .....	53
2.8.4.2 Optimierung der Amplifikation von <i>mxoF</i> .....	56
2.8.5 Agarose-Gelelektrophorese .....	59
2.8.6 Reinigung der PCR-Produkte von <i>mxoF</i> , <i>mch</i> und <i>fae</i> .....	59
2.8.7 TRFLP-Analyse zur Identifizierung von Methanol-induzierten Genotypen .....	60
2.8.8 Taxonomische Einordnung der Isolate .....	61
2.8.9 Analyse der funktionellen Genmarker <i>mxoF</i> , <i>mch</i> und <i>fae</i> mittels Amplikon- Pyrosequenzierung .....	62
2.8.9.1 Amplikon-Pyrosequenzierung .....	62
2.8.9.2 Bereinigung des Sequenzdatensatzes .....	64
2.8.9.3 Berechnung von Cut-Off-Werten zur Differenzierung von OTUs .....	65
2.8.9.3.1 Berechnung eines Cut-Off-Wertes zur Differenzierung von OTUs auf Speziesebene .....	65
2.8.9.3.2 Berechnung eines Datensatz-basierten Cut-Off-Wertes zur Differenzierung von OTUs .....	68
2.9 Erstellen von Stammbäumen .....	68
2.10 Deskriptive Statistik .....	68
2.10.1 Mittelwert und Standardabweichung .....	68
2.10.2 Abschätzung des Stichprobenumfangs .....	69
2.10.3 Abschätzung der Anzahl der OTUs .....	69
2.10.4 Artendiversität .....	70
2.11 Explorative Statistik .....	70
2.11.1 Prozentuale Häufigkeiten .....	71
2.11.2 Systematisierung der Daten und Normalverteilungstest .....	71
2.11.3 Univariate Statistik .....	71
2.11.3.1 Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten $r_s$ nach Spearman .....	72
2.11.3.2 U-Test (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test) .....	72
2.11.3.3 Identifizierung von Indikatorarten .....	73

---

2.11.4 Multivariate Statistik.....	74
2.11.4.1 Detrended Korrespondenzanalyse (DCA) .....	74
2.11.4.2 Kanonische Korrespondenzanalyse (CCA) und Monte Carlo Test .....	75
2.11.4.3 Erstellung der Ordinationsdiagramme .....	75
2.11.4.4 Überprüfung der CCA .....	76
2.12 Zu dieser Arbeit beitragende Ergebnisse.....	77
3. ERGEBISSE .....	78
3.1 Bodenparameter .....	78
3.2 Biologischer Abbau von Methanol.....	81
3.2.1 Oxidation von Methanol und apparente kinetische Parameter in Bodenaufschlammungen .....	81
3.2.2 Wiederfindung des radioaktiv-markierten Kohlenstoffs .....	85
3.2.3 Effekt von Methanol auf die <i>mch</i> -Genotypenzusammensetzung im Boden.....	87
3.3 Biogeographische Diversität .....	90
3.3.1 Korrelation von physiologischen und Umweltparametern mit Zellzahlen.....	90
3.3.2 Cut-Off-Wert zur Differenzierung von OTUs .....	94
3.3.3 Beschreibung der Amplikon-Pyrosequenzierungsdatensätze von <i>mx</i> <i>aF</i> , <i>mch</i> und <i>fae</i> .....	98
3.3.4 Diversität von <i>mx</i> <i>aF</i> .....	101
3.3.5 Korrelation der <i>mx</i> <i>aF</i> -Genotypenzusammensetzung mit Umweltparametern.....	104
3.3.6 Diversität von <i>mch</i> .....	107
3.3.7 Korrelation der <i>mch</i> -Genotypenzusammensetzung mit Umweltparametern.....	109
3.3.8 Diversität von <i>fae</i> .....	114
3.3.9 Korrelation der <i>fae</i> -Genotypenzusammensetzung mit Umweltparametern .....	117
3.3.10 Reinkulturen .....	120
4 DISKUSSION .....	122
4.1 Oxidation von <i>in situ</i> relevanten Methanolkonzentrationen durch methylotherpe <i>Bacteria</i> in Grünlandböden .....	122
4.2 Umweltparameter, die mit den Zellzahlen von potenziellen Methylotherphen und der Genotypenzusammensetzung von <i>mx</i> <i>aF</i> , <i>mch</i> und <i>fae</i> korrelierten .....	126
4.3 $\alpha$ -Diversität methylotherper Prokaryoten .....	131
4.3.1 <i>Alphaproteobacteria</i> , die wichtigste Gruppe der Methylotherphen in oxischen Böden.....	132
4.3.2 Wenig abundante Methylotherpe in oxischen Böden .....	134
4.3.3 Hinweise auf neue Methylotherpe.....	136
4.3.4 Nicht-methylotherpe Taxa.....	138
4.4 Modell: Atmosphärische Methanoloxidation in oxischen Böden und Nischen- definierende Faktoren methylotherper Gemeinschaften .....	138
4.5 Diversitätsanalyse durch Amplikon-Pyrosequenzierung .....	140
4.6 Offene Fragen.....	141
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	143

6 ABSTRACT .....	145
7 LITERATURVERZEICHNIS.....	147
ANHANG.....	186
DANKSAGUNG.....	191
PUBLIKATIONEN.....	192
ERKLÄRUNG .....	194



## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abb. 1:</b> Der globale Methanolhaushalt .....	4
<b>Abb. 2:</b> Schematische Darstellung des Methanol-abhängigen Metabolismus von methylo trophen <i>Bacteria</i> .....	14
<b>Abb. 3:</b> Geographische Lage der drei Exploratorien in Deutschland .....	29
<b>Abb. 4:</b> Schematische Darstellung der zweistufigen CO <sub>2</sub> -Falle.. .....	35
<b>Abb. 5:</b> <i>Arabidopsis thaliana</i> , angezogen unter sterilen Bedingungen.....	38
<b>Abb. 6:</b> Zusammenfassung der Ergebnisse der DNA Extraktion aus 0,5 g <sub>FG</sub> Boden durch verschiedene Extraktionsprotokolle und anschließender <i>mxoF</i> -Amplifikation.....	57
<b>Abb. 7:</b> Mineralisiertes <sup>14</sup> C-Methanol in Ansätzen mit Boden und Pflanzenmaterial nach 13 Tagen Inkubation bei Raumtemperatur .....	81
<b>Abb. 8:</b> Mineralisierung von Methanol in Ansätzen mit Boden OG und sterilem Wasser ....	82
<b>Abb. 9:</b> Lineare Auftragung der gemittelten Oxidationsraten der Duplikate gegen die Methanolkonzentration zur Bestimmung von apparenten Michaelis-Menten-Kinetiken.....	84
<b>Abb. 10:</b> Wiedergefundene Radioaktivität .....	86
<b>Abb. 11:</b> Relative Fluoreszenzintensitäten der <i>mch</i> -TRFs in Bodenaufschlämmungen von HEG 6 nach Supplementation von Methanol.....	87
<b>Abb. 12:</b> Phylogenetischer Mch-Baum.....	89
<b>Abb. 13:</b> CA der relativen Häufigkeiten der Zellzahlen .....	94
<b>Abb. 14:</b> Korrelation der Ähnlichkeitskoeffizienten S von DNA- bzw. <i>in silico</i> translatierten <i>mxoF</i> -Sequenzen mit den entsprechenden Ähnlichkeitskoeffizienten der 16S rRNA Gene.....	95
<b>Abb. 15:</b> Korrelation der Anzahl der erhaltenen OTUs mit verschiedenen Cut-Off-Werten von <i>mxoF</i> , <i>mch</i> und <i>fae</i> . .....	96
<b>Abb. 16:</b> Korrelation der Ähnlichkeitskoeffizienten S von DNA- bzw. <i>in silico</i> translatierten <i>mch</i> -Sequenzen mit den entsprechenden Ähnlichkeitskoeffizienten der 16S rRNA Gene.....	97
<b>Abb. 17:</b> Korrelation der Ähnlichkeitskoeffizienten S von DNA- bzw. <i>in silico</i> translatierten <i>fae</i> -Sequenzen mit den entsprechenden Ähnlichkeitskoeffizienten der 16S rRNA Gene.....	98
<b>Abb. 18:</b> Phylogenetischer MxoF-Baum.....	102

<b>Abb. 19:</b> Genotypenzusammensetzung von <i>mxoF</i> in Böden der Exploratorien Schwäbische Alb (AEG 2, AEG 7, AEW 5, AEW 8), Hainich (HEG 6, HEG 9, HEW 5, HEW 12) und Schorfheide-Chorin (SEG 2, SEG 6) .....	103
<b>Abb. 20:</b> CA des <i>mxoF</i> -Datensatzes.....	106
<b>Abb. 21:</b> Genotypenzusammensetzung von <i>mch</i> in den Böden der Exploratorien Schwäbische Alb (AEG 2, AEG 7, AEW 5, AEW 8), Hainich (HEG 6, HEG 9, HEW 5, HEW 12) und Schorfheide-Chorin (SEG 2, SEG 6, SEW 9) .....	108
<b>Abb. 22:</b> CA des <i>mch</i> -Datensatzes, rarefiziert auf 150 Sequenzen pro Boden .....	111
<b>Abb. 23:</b> CA des <i>mch</i> -Datensatzes, rarefiziert auf 470 Sequenzen pro Boden .....	113
<b>Abb. 24:</b> Phylogenetischer Fae-Baum. ....	115
<b>Abb. 25:</b> Genotypenzusammensetzung von <i>fae</i> in den Böden der Exploratorien Schwäbische Alb (AEG 2, AEG 7, AEW 5, AEW 8), Hainich (HEG 6, HEG 9, HEW 5, HEW 12) und Schorfheide-Chorin (SEG 2, SEG 6, SEW 9).....	116
<b>Abb. 26:</b> CA des <i>fae</i> -Datensatzes.....	119
<b>Abb. 27:</b> Taxonomische Einordnung der Reinkulturen in Klassen.....	121
<b>Abb. 28:</b> Atmosphärische Methanoxidation in oxischen Böden und Nischen-definierende Faktoren methylotrpher Gemeinschaften .....	139

## TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tab. 1:</b> Liste von Familien, die aerobe Methylo trope beinhalten, mit ausgewählten beschriebenen Arten.....	10
<b>Tab. 2:</b> Ergänzende Liste von gültig beschriebenen Arten, die auf Methanol-haltigem Medium wachsen und nicht in der Publikation von Kolb (Kolb, 2009 a) aufgelistet wurden oder seitdem neu beschrieben wurden.....	11
<b>Tab. 3:</b> Beschreibung der Standorte und durchgeführte Analysen .....	30
<b>Tab. 4:</b> Zeitpunkte der Probenahme.....	32
<b>Tab. 5:</b> Zusammensetzung der Salinelösung .....	35
<b>Tab. 6:</b> Ansätze zur Bestimmung der Methanoxidation durch Boden und Pflanzenmaterial .....	37
<b>Tab. 7:</b> Zusammensetzung der Hypochloridlösung .....	38
<b>Tab. 8:</b> Zusammensetzung des MS Mediums (Murashige und Skoog, 1962).....	38
<b>Tab. 9:</b> Ansätze zur Bestimmung von apparenten Michealis-Menten-Parametern.....	40
<b>Tab. 10:</b> Zusammensetzung des Mediums 125 ( <i>Methylobacterium</i> -Medium, DSMZ) (Atlas, 2005) .....	42
<b>Tab. 11:</b> Zusammensetzung der Spurenelementlösung für Medium 125 (Atlas, 2005).....	43
<b>Tab. 12:</b> Zusammensetzung des Mediums M1 (modifiziert nach Dedysh <i>et al.</i> , 1998; Atlas, 1993) .....	43
<b>Tab. 13:</b> Zusammensetzung der Spurenelementlösung für das Medium M1 .....	43
<b>Tab. 14:</b> Zusammensetzung der Wolfe-Vitaminlösung (Atlas, 1993) .....	43
<b>Tab. 15:</b> Zusammensetzung des Mediums NMS (Whittenbury <i>et al.</i> , 1970) .....	44
<b>Tab. 16:</b> Zusammensetzung der Spurenelementlösung SL 10 a (Whittenbury <i>et al.</i> , 1970).....	44
<b>Tab. 17:</b> Zusammensetzung des Mediums M1 mod (modifiziert nach Glowik, 2008; Atlas, 1993; Dedysh <i>et al.</i> , 1998).....	44
<b>Tab. 18:</b> Ansätze zur Herstellung von Medien mit unterschiedlicher Methanolkonzentration .....	44
<b>Tab. 19:</b> Isolierungsansätze .....	46
<b>Tab. 20:</b> Ansätze zur Bestimmung der Zellzahlen in Medium mit Methanol.....	47

<b>Tab. 21:</b> Differenzen der OD <sub>660</sub> zum Zeitpunkt $t_0$ und $t_{\text{End}}$ berechnet für HEG 6 und Ansatz 7 (Tab. 20) .....	47
<b>Tab. 22:</b> Zusammensetzung des Lysepuffers I und des Lysepuffers II .....	49
<b>Tab. 23:</b> Zusammensetzung des EB Puffers .....	51
<b>Tab. 24:</b> Zusammensetzung des Kaliumphosphatpuffers (240 mM, pH 8) (Lösung 1) .....	51
<b>Tab. 25:</b> Zusammensetzung der CTAB-NaCl Lösung (Lösung 2).....	51
<b>Tab. 26:</b> Zusammensetzung des Präzipitationspuffers PEG 6000.....	51
<b>Tab. 27:</b> Sequenzen und Zielgene der verwendeten Primer.....	53
<b>Tab. 28:</b> Reaktionsansatz der PCR zur Amplifikation von <i>mch</i> für die TRFLP-Analyse .....	54
<b>Tab. 29:</b> PCR-Ansätze zur Amplifikation von Teilsequenzen der funktionellen Gene <i>mxoF</i> , <i>mch</i> und <i>fae</i> für die Amplikon-Pyrosequenzierung und PCR-Ansätze zur Amplifikation der 16S rRNA Gene der Isolate .....	55
<b>Tab. 30:</b> Thermoprotokolle zur Amplifikation von Teilsequenzen der Gene <i>mxoF</i> , <i>mch</i> , <i>fae</i> und des Gens für die 16S rRNA.....	56
<b>Tab. 31:</b> Zusammensetzung des TAE-Puffers der Firma Millipore (Millipore, Bedford, US).....	59
<b>Tab. 32:</b> Zusammensetzung des modifizierten TAE-Puffers der Firma Millipore (Millipore, Bedford, US).....	59
<b>Tab. 33:</b> Ansatz für den Verdau mit Mung Bean Nuklease .....	61
<b>Tab. 34:</b> Ansatz für den Verdau mit den Restriktionsenzymen BslI .....	61
<b>Tab. 35:</b> Sequenzen für die Berechnung eines Cut-Off-Wertes für <i>mxoF</i> -Teilsequenzen zur Differenzierung von OTUs auf Speziesebene .....	66
<b>Tab. 36:</b> Sequenzen für die Berechnung eines Cut-Off-Wertes für <i>mch</i> -Teilsequenzen zur Differenzierung von OTUs auf Speziesebene .....	67
<b>Tab. 37:</b> Sequenzen für die Berechnung eines Cut-Off-Wertes für <i>fae</i> -Teilsequenzen zur Differenzierung von OTUs auf Speziesebene .....	67
<b>Tab. 38:</b> Beiträge zu dieser Doktorarbeit.....	77
<b>Tab. 39:</b> Wichtige Parameter der Böden .....	78
<b>Tab. 40:</b> Korrelation der metrischen Bodenparameter .....	79
<b>Tab. 41:</b> Vergleich der Umweltparameter, die für Standorte mit unterschiedlichem Vegetationstyp und unterschiedlicher Landnutzungsintensität bestimmt wurden ...	80

<b>Tab. 42:</b> Apparente kinetische Parameter der Grünlandböden OG, FG und HEG 6. ....	83
<b>Tab. 43:</b> Höchste und gemittelte Zellzahlen verschiedener Böden aus neun verschiedenen Ansätzen.....	90
<b>Tab. 44:</b> Logarithmierte Differenzen der Zellzahlen der Ansätzen mit M1 mod Medium. ....	91
<b>Tab. 45:</b> Ergebnisse des Normalverteilungstests nach Shapiro-Wilk für die relativen Häufigkeiten der Zellzahlen .....	92
<b>Tab. 46:</b> Ergebnisse des Monte Carlo Tests für relative Häufigkeiten der Zellzahlen und Umweltparameter .....	93
<b>Tab. 47:</b> Zusammenfassung der Pyrosequenzierungsdaten .....	99
<b>Tab. 48:</b> Ergebnisse des Normalverteilungstests nach Shapiro-Wilk für den <i>mx</i> <i>aF</i> -Datensatz .....	104
<b>Tab. 49:</b> Ergebnisse des Monte Carlo Tests für den <i>mx</i> <i>aF</i> -Datensatz und Umweltparameter .....	105
<b>Tab. 50:</b> Ergebnisse des Normalverteilungstests nach Shapiro-Wilk für den <i>mch</i> -Datensatz, rarefiziert auf 470 Sequenzen pro Boden .....	109
<b>Tab. 51:</b> Ergebnisse des Monte Carlo Tests für den <i>mch</i> -Datensatz, rarefiziert auf 150 Sequenzen pro Boden und Umweltparameter.....	110
<b>Tab. 52:</b> Ergebnisse des Monte Carlo Tests für den <i>mch</i> -Datensatz, rarefiziert auf 470 Sequenzen pro Boden und Umweltparameter.....	112
<b>Tab. 53:</b> Ergebnisse des Normalverteilungstests nach Shapiro-Wilk für den <i>fae</i> -Datensatz .....	117
<b>Tab. 54:</b> Ergebnisse des Monte Carlo Tests für den <i>fae</i> -Datensatz und Umweltparameter .....	118
<b>Tab. A:</b> Ergebnisse der BLAST-Analyse zur taxonomischen Einordnung der Isolate zusammen mit den jeweiligen Kultivierungsbedingungen .....	186
<b>Tab. B:</b> Absolute Mengen an Radioaktivität (dpm), die in den Reaktionsgefäßen der CO <sub>2</sub> -Falle (Abb. 4) im Rahmen des Versuches "Methanoloxidation in Bodenaufschlämmungen und durch Pflanzenmaterial" (2.6.2; Abb. 7) aufgefangen wurden.....	189
<b>Tab. C:</b> Absolute Mengen an Radioaktivität (dpm), die in den Reaktionsgefäßen der CO <sub>2</sub> - Falle (Abb. 4) im Rahmen des Versuches "Wiederfindung des radioaktiv-markierten Kohlenstoffs" (2.6.5; Abb. 10) aufgefangen wurden.....	190

## VERZEICHNIS DER GLEICHUNGEN

<b>Gleichung 1:</b> Michaelis-Menten-Kinetik. ....	39
<b>Gleichung 2:</b> Spezifische Affinität $a^0_s$ . ....	40
<b>Gleichung 3:</b> $v_{\max}$ in Millimol pro Liter und Tag. ....	41
<b>Gleichung 4:</b> Ähnlichkeitskoeffizient S. ....	65
<b>Gleichung 5:</b> Arithmetischer Mittelwert $\bar{X}$ . ....	68
<b>Gleichung 6:</b> Standardabweichung s. ....	69
<b>Gleichung 7:</b> Varianz $s^2$ . ....	69
<b>Gleichung 8:</b> Coverage C. ....	69
<b>Gleichung 9:</b> Chao 1. ....	69
<b>Gleichung 10:</b> Shannon-Index $H'$ . ....	70
<b>Gleichung 11:</b> Evenness-Index $J'$ . ....	70
<b>Gleichung 12:</b> Prozentuale Häufigkeit A. ....	71
<b>Gleichung 13:</b> Rangkorrelationskoeffizient $r_s$ nach Spearman. ....	72
<b>Gleichung 14:</b> Indikatorwert $IV_{kj}$ . ....	73
<b>Gleichung 15:</b> Relative Abundanz $RA_{kj}$ der Art in der Gruppe im Verhältnis zur Abundanz im ganzen Datensatz. ....	73
<b>Gleichung 16:</b> Relative Frequenz $RF_{kj}$ . ....	73

## VERZEICHNIS DER BEISPIELRECHNUNGEN

<b>Beispielrechnung 1:</b> Bestimmung der $CO_2$ -Menge, die durch Methanoloxidation gebildet wurde. ....	36
<b>Beispielrechnung 2:</b> Bestimmung der MPN und Zellzahl pro ml. ....	48
<b>Beispielrechnung 3:</b> Bestimmung der oberen und unteren Grenzen der Zellzahlen pro ml, innerhalb derer die tatsächliche Zellzahl mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% liegt. ....	48

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AEG	Grünlandboden des Exploratoriums Schwäbischen Alb
AEW	Waldboden des Exploratoriums Schwäbischen Alb
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tool“
Bp	Basenpaare
C1-Verbindung	Kohlenstoffverbindung ohne Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung
CA	„Correspondence Analysis“ (Korrespondenzanalyse)
CCA	„Canonical Correspondence Analysis“ (Kanonische Korrespondenzanalyse)
CH	Schweiz
CH <sub>3</sub> OH	Methanol
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
cpm	„counts per minute“ (Impulse pro Minute)
d <sup>-1</sup>	pro Tag
DCA	„Detrended“ Korrespondenzanalyse
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt entsalztes Wasser
DE	Deutschland
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpm	„disintegrations per minute“ (Desintegrationen pro Minute)
Fae	Formaldehyd-aktivierendes Enzym
FG	Frischgewicht
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
H <sub>4</sub> F	Tetrahydrofolat
H <sub>4</sub> MPT	Tetrahyromethanopterin
HEG	Grünlandboden des Exploratoriums Hainich
HEW	Waldboden des Exploratoriums Hainich
KS	Südkorea
Mch	Methenyl-H <sub>4</sub> MPT Cyclohydrolase
MDH	Methanoldehydrogenase
MMO	Methanmonooxygenase
MPN	„Most Probable Number“ (Wahrscheinlichste Keimzahl)
OTU	„Operational Taxonomic Unit“
PCA	„Principal Component Analysis“ (Hauptkomponentenanalyse)
PCR	„Polymerase Chain Reaction“ (Polymeraseketten-Reaktion)
ppb	„parts per billion“ (Teile pro Milliarde)
pptv	„parts per trillion by volume“ (Volumenmischungsverhältnis, Teile pro Billion)
PQQ	Pyrrolochinolinchinon
PTR-MS	„Proton-Transfer-Reaction Mass Spectrometry“ (Protonentausch-Reaktions-Massenspektrometrie)

PVP	Polyvinylpyrrolidon
rpm	„revolutions per minute" (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RuMP	Ribulosemonophosphat
SD	„Standard Deviation" (Standardabweichung)
SEG	Grünlandboden des Exploratoriums Schorfheide-Chorin
SEW	Waldboden des Exploratoriums Schorfheide-Chorin
TG	Trockengewicht
TRFLP	„Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism" (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus)
UK	Großbritannien
US	Vereinigte Staaten von Amerika



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Die „Virtuosität“ der Methyлотроphen

Methyлотроphe Mikroorganismen sind in der Wissenschaft schon lange bekannt. Sie wurden erstmals vor mehr als 120 Jahren in Form von *Bacillus methylicus* isoliert (Loew, 1892). Loew beschrieb einen Organismus, der auf Methanol, Methylamin oder Formaldehyd wuchs. Dieser Organismus wurde später in Form von *Methylobacterium extorquens* neu isoliert und ist heute ein wichtiger Modellorganismus für Studien der biochemischen Eigenschaften von Methyлотроphen (Murrell und McDonald, 2003). Bis in die 1950er Jahre war man der Meinung, dass Methyлотроphe durch die Kopplung der Oxidation von reduzierten Kohlenstoffverbindungen ohne energiereiche Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung (C1-Verbindungen) mit der Reduktion von Kohlenstoffdioxid Energie gewinnen (Peel und Quayle, 1961; van Niel, 1954). Das wissenschaftliche Interesse an methyлотроphen Mikroorganismen war bis dahin eher gering (Anthony, 1982). Erst später wurde erkannt, dass Methyлотроphe einen einzigartigen Stoffwechselweg besitzen (Kaneda und Roxburgh, 1959 a, b). Diese Einzigartigkeit veranlasste Quayle, der zu dieser Zeit an C1-Assimilationswegen forschte, dazu, Methyлотроphe als „Virtuosen der Biosynthese“ zu bezeichnen (Anthony, 1982). Methyлотроphe können C1-Verbindungen wie z.B. Methanol, Methan, methylierte Halogene, Methylamine, Formaldehyd oder methylierte Schwefelverbindungen als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen (Anthony, 1982; Chistoserdova *et al.*, 2009; Lidstrom, 2006). Das wissenschaftliche Interesse an dieser Organismengruppe stieg und führte 1970 zur Isolierung von über 100 neuen methyлотроphen Arten (Whittenbury *et al.*, 1970).

Einige C1-Verbindungen (z.B. Methan, Methanol, Chlormethan, Brommethan), die von Methyлотроphen oxidiert werden können, sind wichtige Komponenten der Atmosphärenchemie und beeinflussen den Energiegehalt der Atmosphäre (Conrad, 2009; Dunfield, 2007; Forster *et al.*, 2007; Trotsenko und Murrell, 2008). Methyлотроphe sind daher nicht nur wegen ihren biochemischen Eigenschaften Thema zahlreicher wissenschaftlicher Studien, sondern auch wegen ihrer Rolle als potenzielle biologische Senken von klimarelevanten Verbindungen. Das C1-Substrat, das in diesem Zusammenhang bisher am meisten Aufmerksamkeit erhalten hat, ist Methan. Das relative Treibhauspotential von Methan, auf die letzten 100 Jahre berechnet, entspricht dem 25-fachen Treibhauspotenzial von Kohlenstoffdioxid (Forster *et al.*, 2007). Des Weiteren hat Methan im Vergleich zu anderen organischen Verbindungen in der Atmosphäre die höchste Konzentration (etwa 1770 ppb; Conrad, 2009; Forster *et al.*, 2007). Die Oxidation von Methan und die Diversität von Methan-oxidierenden Mikroorganismen in terrestrischen Ökosystemen wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht (z.B. Dong *et al.*, 1998; Goldman *et al.*, 1995; Henckel *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000). Wenig ist hingegen über den Prozess der biologischen Methanoxidation und über die Diversität von Methanol-oxidierenden Mikroorganismen bekannt. Dabei können die meisten bekannten Methyлотроphen Methanol und nicht Methan als Substrat nutzen (Kolb, 2009 a). Auch Methanol ist ein klimarelevantes Gas (1.2) und trägt innerhalb der ersten 100 Jahre nach seiner Freisetzung fast dreimal so viel zum

Treibhauseffekt bei wie Kohlenstoffdioxid (Forster *et al.*, 2007). Dieser Wert für das relative Treibhauspotenzial kommt durch indirekte Effekte von Degradationsprodukten des Methanols (z.B. Veränderung der Ozonkonzentration in der Atmosphäre) zustande (1.2) (Forster *et al.*, 2007). Methanol ist nach Methan das zweithäufigste organische Molekül in der Atmosphäre. In der bodennahen troposphärischen Grenzschicht beträgt die Methanolkonzentration 1-10 ppb, in der höheren Troposphäre liegt sie bei 0,1 bis 1 ppb (Heikes *et al.*, 2002; Jacob *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 1995). Ziel dieser Doktorarbeit war es, grundlegende Erkenntnisse über die Bedeutung von Methyлотроphen als potenzielle biologische Methanolsenken im globalen Methanolkreislauf zu gewinnen und ein möglichst umfassendes Bild der Diversität der Methyлотроphen in Böden gemäßigter Klimate zu erhalten.

## **1.2 Die Bedeutung von Methanol für die globale Atmosphärenchemie**

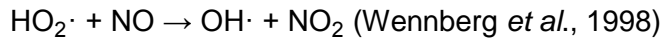
Methanol zählt zu den biogenen flüchtigen organischen Verbindungen in der Atmosphäre (Reactive Volatile Organic Compounds, RVOCs) (Atkinson und Arey, 2003). Es hat einen hohen Dampfdruck (128 hPa bei 20°C) und ist an photochemischen Reaktionen in der Atmosphäre beteiligt. Eine genaue Vorhersage der Wirkung von Methanol in den verschiedenen atmosphärischen Schichten ist schwierig, da nur wenig über Methanolemissionsraten und den globalen Methanolhaushalt bekannt ist. In Simulationsversuchen stieg die globale Ozonkonzentration unter Einbeziehung des troposphärischen Methanols um ein bis zwei Prozent. Gleichzeitig stiegen die globale Formaldehydkonzentration und die Konzentration an Perhydroxylradikalen um drei bis neun Prozent bzw. um drei bis fünf Prozent (Tie *et al.*, 2003). Eine mögliche Ursache für diesen Effekt ist die Reaktion von Methanol mit Hydroxylradikalen (OH·) und Sauerstoff zu Formaldehyd, Perhydroxylradikalen (HO<sub>2</sub>·) und Wasser (Reaktionsgleichung 1).

Reaktionsgleichung 1:

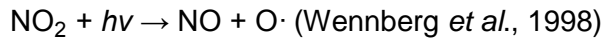


Der photochemische Abbau von Formaldehyd führt zur Bildung von zwei weiteren Perhydroxylradikalen, die mit Stickstoffmonoxid reagieren können und zur Bildung von troposphärischem Ozon führen (Reaktionsgleichungen 2 bis 4). Eine Erhöhung der Ozonkonzentration in der Troposphäre trägt zur globalen Erwärmung bei, denn Ozon ist ein wichtiges Treibhausgas und trägt etwa 5% bis 16% zum anthropogenen Treibhauseffekt bei (Ainsworth *et al.*, 2012; Forster *et al.*, 2007).

Reaktionsgleichung 2:



Reaktionsgleichung 3:



$h\nu$ , Strahlung.

Reaktionsgleichung 4:



Methanol ist eine wichtige Quelle für troposphärisches Kohlenstoffmonoxid. Sechs bis neun Prozent der globalen Kohlenstoffmonoxidproduktion sind auf Oxidationsreaktionen von Methanol zurückzuführen (Jacob *et al.*, 2005). Die Oxidation von Kohlenstoffmonoxid durch Hydroxylradikale ist ein bedeutender Mechanismus zur Produktion von Perhydroxylradikalen (Reaktionsgleichung 5) und damit zur Ozonbildung in der Troposphäre (Reaktionsgleichungen 2 bis 4).

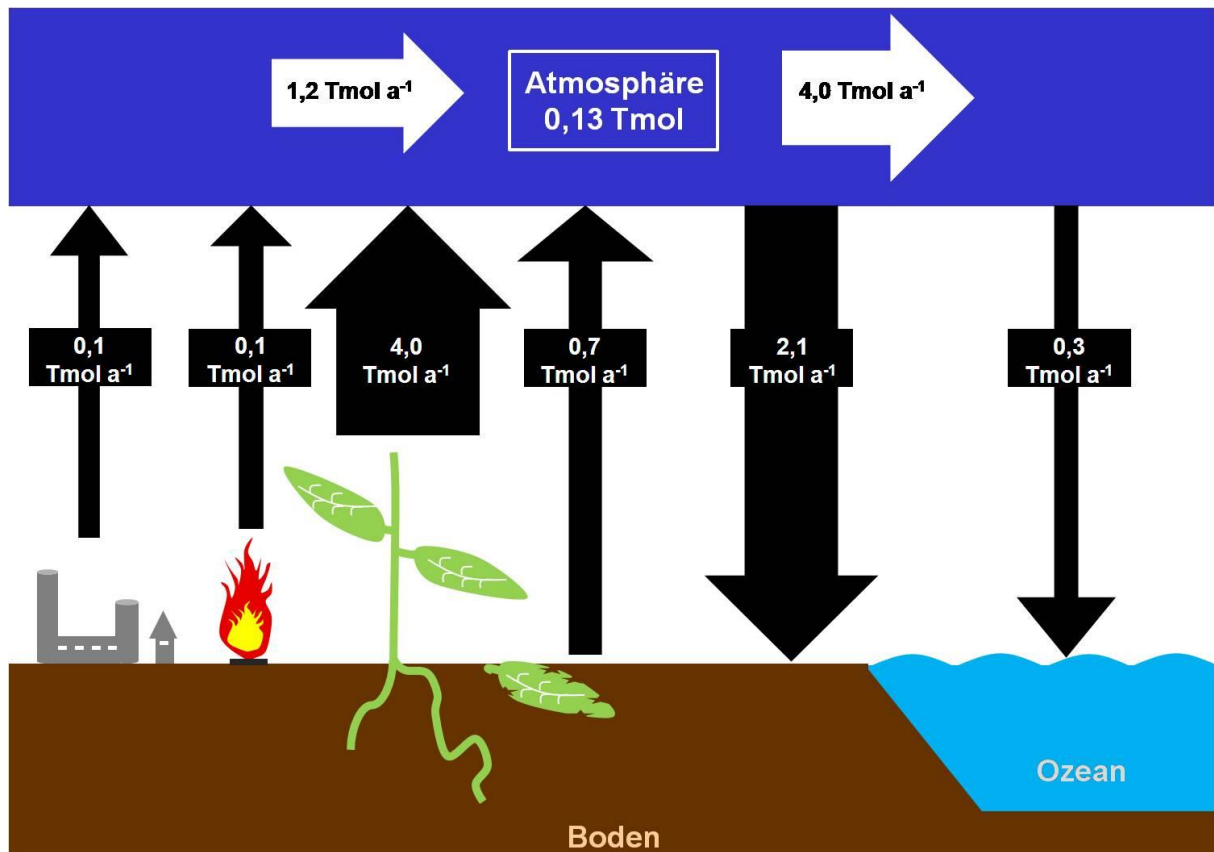
Reaktionsgleichung 5:



Die mittlere photochemische Lebensdauer von Methanol in der freien Atmosphäre beträgt etwa 16 Tage. Ein Transport von Methanol aus den bodennahen Grenzschichten in die mittlere und höhere Troposphäre ist möglich (Singh *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 1995; Warneke *et al.*, 1999). Der Methanolabbau durch die Reaktion mit Hydroxylradikalen in der Stratosphäre macht etwa zwei Prozent des troposphärischen Methanolabbaus aus (Jacob *et al.*, 2005). Durch die Methanoloxidation in der Stratosphäre können Radikale entstehen (Reaktionsgleichung 1), die mit Ozon reagieren (Wennberg *et al.*, 1998). Die Ozonschicht in der Stratosphäre wird dadurch abgebaut und es gelangt mehr energiereiche UV-Strahlung auf die Erde. Sowohl die Erhöhung der Konzentration des bodennahen Ozons, als auch der Abbau der stratosphärischen Ozonschicht können demnach den Energiehaushalt der Atmosphäre beeinflussen und die UV-Strahlenbelastung an der Erdoberfläche erhöhen.

### 1.3 Der globale Methanolhaushalt

Die globale Emissionsrate von Methanol (etwa 5 Tmol pro Jahr, Abb. 1) (Galbally und Kristine 2002; Jacob *et al.*, 2005) ist vergleichbar mit der globalen Emissionsrate des Treibhausgases Methan (10 Tmol pro Jahr) (Jacob *et al.*, 2005).



**Abb. 1:** Der globale Methanolhaushalt. Folgende terrestrische Komponenten des globalen Methanolhaushaltes sind von links nach rechts symbolisiert: Methanolemission durch industrielle Aktivitäten, Methanolemission durch Verbrennen von Biomasse, Methanolemission durch lebende Pflanzen, Methanolemission durch absterbende Pflanzenteile, Deposition (trocken und feucht) von Methanol auf die Erdoberfläche. Des Weiteren sind die Nettoaufnahme von Methanol durch Ozeane und die Bildung und der Abbau von Methanol in der Atmosphäre symbolisiert. Der Zahlenwert des Methanolbestandes in der Atmosphäre ist durch ein weißes Rechteck gekennzeichnet. Zahlenwerte der Pfeile geben die Menge an emittiertem bzw. abgelagertem und in der Atmosphäre gebildetem bzw. abgebautem Methanol pro Jahr (a<sup>-1</sup>) an und basieren auf den Berechnungen von Jacob *et al.*, 2005. Schwarze Pfeile, Methanolemission und Methanoldeposition auf die Erdoberfläche; Weiße Pfeile, Methanolproduktion und Methanolabbau in der Atmosphäre.

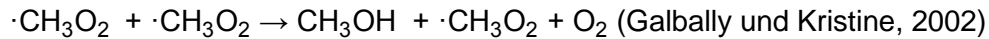
Die wichtigsten Methanolquellen sind Pflanzen und deren Reste (Abb. 1) (Galbally und Kristine, 2002; Jacob *et al.*, 2005). Die durchschnittliche Methanolkonzentration in älteren und jüngeren Bohnenblättern liegt bei 0,3 und 0,8 Mikromol pro Gramm Frischgewicht ( $\mu\text{mol g}_{\text{FG}}^{-1}$ ). Würde kein neues Methanol produziert, dann würde der gesamte Methanolgehalt der Bohnenblätter auf Grund des Gasflusses innerhalb von drei Stunden über die Stomata in die Atmosphäre entweichen (Nemecek-Marshall *et al.*, 1995). Das Verhältnis von Methanolemission zu primärer Kohlenstoffproduktion liegt bei 0,024% für Gräser und 0,11% für höhere Pflanzen (Galbally und Kristine, 2002; Jacob *et al.*, 2005). Analysen der Isotopenzusammensetzung zeigten, dass die Methoxylgruppen im Pektin und Lignin von Pflanzen wichtige Quellen von Methanol und anderen C1-Verbindungen wie Methan oder Halomethanen sind. Diese C1-Verbindungen sind wichtige Substrate von Methyлотrophen (Keppler *et al.*, 2004).

62% des global gebildeten Methanols werden von wachsenden Pflanzen in die Atmosphäre abgegeben (Abb. 1) (Jacob *et al.*, 2005). Methylierte Polygalakturonsäuren im Pektin der Zellwand wachsender Pflanzen werden durch das Enzym Pektinmethylesterase demethyliert. Dabei entstehen ionisierte Polygalakturonsäurereste und Methanol (Frenkel *et al.*, 1998; Galbally und Kristine, 2002; Mangos und Haas, 1997; McFeeter und Armstrong, 1984). Die ionisierten Polygalakturonsäurereste werden untereinander über Calciumbrücken quervernetzt und so die Zellwand stabilisiert (Fall und Benson, 1996; Galbally und Kristine, 2002; Jarvis 1984). Das entstandene Methanol wird entweder im Pflanzengewebe gespeichert und über Methanoxidasen zu Formaldehyd oxidiert oder über geöffnete Stomata an die Atmosphäre abgegeben (Fall und Benson, 1996; Galbally und Kristine, 2002; Gout *et al.*, 2000).

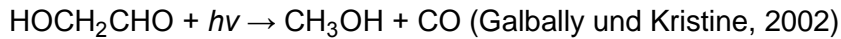
Etwa 11% des jährlich weltweit gebildeten Methanols stammt von abgestorbenem Pflanzenmaterial (Abb. 1) (Jacob *et al.*, 2005). Mögliche Ursachen für diese Quelle des atmosphärischen Methanols sind die Demethylierung von Pektin durch Pektinmethylesterasen, die auch in totem Pflanzenmaterial aktiv sein können, und die Demethylierung von Lignin während des Abbaus von totem Pflanzenmaterial durch Pilze (Galbally und Kristine, 2002). Das Methanol stammt dabei vom Ligninpolymer selbst oder von den Degradationsprodukten des Lignins. *Phanerochaete chrysosporium* und andere Lignin-abbauende Pilze bilden Lignin-abbauende Exoenzyme wie Lignin-Peroxidasen und depolymerisieren so chemisch stabile Lignin-Makromoleküle (Broda *et al.*, 1996). In Kultivierungsversuchen wurde gezeigt, dass *P. chrysosporium* unter optimalen Bedingungen innerhalb von 24 Stunden bis zu 25% der Methoxylgruppen des Lignins zu Methanol umsetzte (Ander *et al.*, 1985).

Eine andere wichtige Methanolquelle des globalen Methanolkreislaufes ist die Atmosphäre. 19% des global gebildeten Methanols werden in der Atmosphäre produziert (Abb. 1) (Jacob *et al.*, 2005). Eine Möglichkeit der atmosphärischen Methanolbildung ist die Reaktion von Methylperoxyradikalen ( $\cdot\text{CH}_3\text{O}_2$ ) mit sich selbst (Reaktionsgleichung 6). Eine weitere atmosphärische Methanolquelle ist die Photolyse von Glykolaldehyd (Reaktionsgleichung 7).

Reaktionsgleichung 6:



Reaktionsgleichung 7:



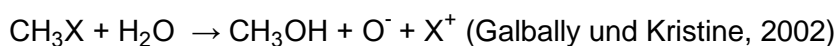
$h\nu$ , Strahlung.

Die Emission von Methanol durch industrielle Aktivitäten und durch Verbrennen von Biomasse (Abb. 1) trägt etwa 8% zur globalen Methanolbildung bei (Jacob *et al.*, 2005). In der Industrie wird Methanol unter anderem als Treibstoff, als Lösungsmittel oder als Frostschutzmittel eingesetzt (Galbally und Kristine, 2002). Bei der Verbrennung von Biomasse wird Methanol durch die Pyrolyse von Methyl- und Methoxylgruppen im Lignin und in Hemicellulosen freigesetzt (Galbally und Kristine, 2002; McKenzie *et al.*, 1995).

Die Methanolkonzentration in der Atmosphäre wird durch die Methanolsenken des globalen Methanolkreislaufes reduziert. Ein Großteil (63%) des weltweit gebildeten Methanols wird durch Hydroxylradikale in der Atmosphäre oxidiert (Abb. 1) (1.2) (Jacob *et al.*, 2005). 39% des weltweit gebildeten Methanols gelangen als feuchte und trockene Deposition auf die Erdoberfläche (Abb. 1). Böden terrestrischer Ökosysteme sind demnach eine wichtige globale Senke für atmosphärisches Methanol. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Methanol im Boden durch Methylotrophe oxidiert werden könnte (Galbally und Kristine, 2002; Kolb, 2009 a). In der Konsequenz würde dadurch die Menge an Methanol, die in die Atmosphäre emittiert wird, reduziert und abgelagertes Methanol aus dem Boden entfernt. Über den Prozess der Methanoxidation und den daran beteiligten Mikroorganismen in Böden ist jedoch nur wenig bekannt (1.5).

Neben den terrestrischen Ökosystemen und den chemischen Reaktionen in der Atmosphäre spielen auch Ozeane eine wichtige Rolle im globalen Methanolkreislauf. Ozeane sind sowohl Methanolquellen als auch -senken. Netto werden etwa 5% des global gebildeten Methanols von Ozeanen aufgenommen (Abb. 1). In Ozeanen kann Methanol durch Hydrolyse aus methylierten Halogenverbindungen entstehen (Reaktionsgleichung 8) (Galbally und Kristine, 2002).

Reaktionsgleichung 8:



X, Halogen.

Das Phytoplankton könnte eine biologische Methanolquelle in Ozeanen sein (Heikes *et al.*, 2002; Milne *et al.*, 1995). Die Reaktion mit freien Radikalen führt in Ozeanen zum Methanolabbau (Galbally und Kristine, 2002). Eine wichtige biologische Methanolsenke in Ozeanen sind methylorophe *Bacteria*. Es wurde gezeigt, dass *in situ* relevante Methankonzentrationen von Methylotrophen in Meerwasserproben oxidiert werden können. Des Weiteren wurden kinetische Parameter der Methanoloxidation durch *Bacteria* in Meerwasserproben bestimmt (Dixon *et al.*, 2011). Derartige Informationen fehlen bisher für terrestrische Ökosysteme.

## 1.4 Methanoloxidation in der Phyllosphäre

Viele Studien (z.B. Anda *et al.*, 2011; Madhaiyan *et al.*, 2012; Meena *et al.*, 2012; Omer *et al.*, 2004; Wellner *et al.*, 2011) befassen sich mit Methylotrophen in der Phyllosphäre, denn Pflanzen sind die wichtigsten Methanolquellen in terrestrischen Ökosystemen (1.3) und damit wichtige Habitate für Methanol-oxidierende Methylotrrophe. Global gesehen ist die Gesamtoberfläche der Blätter von Pflanzen etwa doppelt so groß wie die Bodenoberfläche (Vorholt, 2012). In der Phyllosphäre können methylorophe Arten wie *Methylobacterium extorquens* gasförmiges Methanol, das während des Zellwandmetabolismus der Pflanzen gebildet wird, nutzen (Abanda-Nkpwatt *et al.*, 2006; Sy *et al.*, 2005; Vorholt, 2012). *Methylobacterium* wurde auf Blättern von verschiedenen Pflanzenarten (z.B. *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Trifolium repens*, *Cerastium holosteoides*) nachgewiesen und ist eine der häufigsten Gattungen in der Phyllosphäre (Wellner *et al.*, 2011; Vorholt, 2012). Etwa 16% der Bakterien in der Phyllosphäre von Reis und 6% der Bakterien in der Phyllosphäre von Klee gehören zu der Gattung *Methylobacterium* (Vorholt, 2012). Methylotrrophe in der Phyllosphäre sind folglich eine wichtige biologische Senke von Methanol in terrestrischen Ökosystemen. Neben Methanol emittieren Pflanzen auch andere C1-Verbindungen wie Halomethane (1.3). Chlormethan-nutzende *Hyphomicrobium*-Stämme wurden aus der Phyllosphäre von *Arabidopsis thaliana* isoliert (Nadalig *et al.*, 2011), es ist jedoch nicht klar, ob Chlormethan auch unter *in situ* Bedingungen durch epiphytische Methylotrrophe abgebaut wird (Nadalig *et al.*, 2011; Vorholt, 2012).

Studien an *A. thaliana* und *Medicago truncatula* zeigten, dass der Standort der Pflanze einen größeren Einfluss auf die *Methylobacterium*-Diversität hat als die Pflanzenart. Darüber hinaus ähneln sich die *Methylobacterium*-Populationen in der Phyllosphäre verschiedener Generationen der einjährigen Pflanze *A. thaliana* (Vorholt, 2012; Knief *et al.*, 2010). Möglicherweise werden Bakterien aus dem Boden auf die Pflanzen übertragen, was den Boden zu einem wichtigen Inokulum der Pflanzen machen würde (Romanovskaya *et al.*, 2001; Vorholt, 2012).

## 1.5 Methanoxidation im Boden

Während bereits bekannt ist, dass Methylotrrophe in der Phyllosphäre eine wichtige Senke im globalen Methanolhaushalt sind, ist noch unklar, inwieweit Methylotrrophe im Boden einen Einfluss auf die atmosphärische Methankonzentration haben. Methanol, das von unterirdischen, lebenden oder toten Pflanzenteilen abgegeben wird, kann sich in Bodenwasser lösen (Galbally und Kristine 2002; Kolb, 2009 a). Der Methanolgehalt von Pflanzen wurde jedoch lediglich für Bohnenblätter (1.3), nicht aber für Stämme oder Wurzeln bestimmt (Galbally und Kristine, 2002). Es ist möglich, dass das Methanol, das von den unterirdischen Pflanzenteilen abgegeben wird, teilweise durch Methylotrrophe im Boden oxidiert wird.

Eine weitere wichtige Quelle für Methanol im Boden ist die trockene und feuchte Deposition von atmosphärischem Methanol auf die Erdoberfläche (Abb. 1) (Galbally und Kristine, 2002; Jacob *et al.*, 2005). Es ist möglich, dass das abgelagerte Methanol durch Pflanzenmaterial oder durch Methanol-oxidierende Mikroorganismen auf der Pflanzenoberfläche und im Boden aufgenommen wird (Jacob *et al.*, 2005). Ein Beweis, dass Methanol unter *in situ* Bedingungen im Boden von Methylotrphenen abgebaut wird, fehlt jedoch bis heute (1.10). Es ist somit nicht geklärt, inwieweit Methanol-oxidierende Mikroorganismen im Boden den globalen Methanolhaushalt beeinflussen. Des Weiteren existieren kaum Informationen zu Methanoxidationsraten in Böden. In Mikrokosmos-Versuchen mit Methanol wurde gezeigt, dass 10 g eines oxischen Waldbodens das Potenzial hat, 2,4 mmol Methanol innerhalb von 44 Tagen abzubauen (Radajewski *et al.*, 2002). Apparente Michaelis-Menten-Parameter für die Methanoxidation in oxischen Böden wurden nicht bestimmt. Die *in situ* Methankonzentration in Böden ist bis heute unbekannt. Es ist wahrscheinlich, dass sie maximal im Bereich einiger  $\mu\text{mol pro Kilogramm}$  ( $\mu\text{mol kg}^{-1}$ ) Boden liegt (Conrad und Claus, 2005; Kolb, 2009 a). Auf Grund der heterogenen Verteilung von Methanolquellen (z.B. Pflanzenwurzeln) ist es wahrscheinlich, dass Methanol im Boden ebenfalls heterogen verteilt ist. In der Nähe von Pflanzenmaterial könnte die Methankonzentration höher sein, als in weiter entfernten Bereichen des Bodens.

Methankonzentrationen in Pflanzen und in Anreicherungen werden in der Regel gaschromatographisch in Verbindung mit einem Flammenionisationsdetektor (GC-FID) oder mit Hilfe der Methanol-Oxidase-Methode spektrophotometrisch bestimmt (Morris und Novak, 1989; Nemecek-Marshall *et al.*, 1995; Pontes *et al.*, 2009; Radajewski *et al.*, 2002). Mit diesen Methoden können Methankonzentrationen im mikromolaren Bereich gemessen werden (Pontes *et al.*, 2009). Auf Grund der heterogenen Verteilung von Methanol im Boden liegen die Werte für die Methankonzentration in Bodenmischproben wahrscheinlich unterhalb der Detektionsgrenze dieser Methoden (Kolb, 2009 a). Die Protonenaustausch-Reaktions-Massenspektrometrie („Proton-Transfer-Reaction Mass Spectrometry“, PTR-MS) ist eine sensitivere Methode und wird vor allem zur Messung von atmosphärischem Methanol angewandt. Konzentrationen im Bereich von 10-100 pptv können mit Hilfe der PTR-MS detektiert werden (de Gouw und Warneke, 2007). Allerdings benötigt diese Analytik



große Gasvolumina (über 50 ml; Bunge *et al.*, 2008), was ihre Anwendung für die Analyse von Bodengas- oder Lösungsproben schwierig macht. Zur Analyse des Methanol-Stoffflusses in Pflanzen und Meerwasser ist bislang eine radiochemische Technik eingesetzt worden, bei der durch Zugabe von  $^{14}\text{C}$ -Methanol die Oxidation von Methanol zu  $\text{CO}_2$  in Konzentrationen im nanomolaren Bereich verfolgt werden kann (Cossins, 1964; Dixon *et al.*, 2011). Die radiochemische Technik ist auch eine geeignete Methode, um die Oxidation von *in situ* relevanten Methanolkonzentrationen in Grünlandböden zu analysieren (1.10).

## 1.6 Die Vielfalt der Methyлотроphen

Aerobe Methyлотроphe findet man unter den *Bacteria* und *Eukarya*. Aerobe methyлотроphe *Archaea* wurden bisher nicht isoliert. Zu den Methanol-nutzenden *Eukarya* gehören einige Hefen wie *Candida borneonana* (Sipiczki, 2012). Im Jahr 2009 wurde eine vollständige Liste von aeroben methyлотроphen *Bacteria* publiziert, die 168 gültig beschriebene Arten enthielt (Kolb, 2009 a). Bis heute wurden 208 verschiedene aerobe methyлотроphe Arten gültig beschrieben, die zu den *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Bacilli*, *Betaproteobacteria*, *Flavobacteriia* und *Gammaproteobacteria* gehören (Tab. 1, Tab. 2). Die meisten bisher bekannten methyлотроphen Isolate (119 verschiedene Arten) gehören zu den *Alphaproteobacteria*, was nahelegt, dass *Alphaproteobacteria* auch in methyлотроphen Gemeinschaften im Boden die häufigste Gruppe darstellen könnten (1.10).

**Tab. 1:** Liste von Familien, die aerobe Methylothrophe beinhalten, mit ausgewählten beschriebenen Arten.

Klasse/Familie	Art	CH <sub>3</sub> OH	Referenz
<b>Actinobacteria</b>			
Brevibacteriaceae	<i>Brevibacterium casei</i>	+	Boden <i>et al.</i> , 2008; Kolb, 2009 a
Micrococcaceae	<i>Arthrobacter methylophilus</i>	+	Borodina <i>et al.</i> , 2002; Kolb, 2009 a
Mycobacteriaceae	<i>Mycobacterium farinosum</i>	+	Bojalil <i>et al.</i> , 1962; Kolb, 2009 a; Park <i>et al.</i> , 2003
Nocardiaceae	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	+	Boden <i>et al.</i> , 2008; Kolb, 2009 a
Pseudonocardiaceae	<i>Amycolatopsis methanolica</i>	+	Deboer <i>et al.</i> , 1990; Kolb, 2009 a
<b>Alphaproteobacteria</b>			
Acetobacteraceae	<i>Acidomonas methanolica</i>	+	Yamashita <i>et al.</i> , 2004; Kolb, 2009 a
Beijerinckiaceae	<i>Methylocapsa aurea</i>	+	Dunfield <i>et al.</i> , 2010
Bradyrhizobiaceae	<i>Afipia felis</i>	+	Kolb, 2009 a; Moosvi <i>et al.</i> , 2005
Hyphomicrobiaceae	<i>Angulomicrobium tetraedrale</i>	+	Kolb, 2009 a; Vasileva <i>et al.</i> , 1997
Methylobacteriaceae	<i>Methylobacterium bullatum</i>	+	Hoppe <i>et al.</i> , 2011
Methylocystaceae	<i>Methylopila jiangsuensis</i>	+	Li <i>et al.</i> , 2011
Phyllobacteriaceae	<i>Mesorhizobium loti</i>	+ <sup>a</sup>	Jarvis <i>et al.</i> , 1997; Kolb, 2009 a
Rhizobiaceae	<i>Ensifer fredii</i>	+ <sup>a</sup>	Kolb, 2009; Young, 2003
Rhodobacteraceae	<i>Paracoccus alkenifer</i>	+	Kolb, 2009; Urakami <i>et al.</i> , 1989
Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas melonis</i>	+	Boden <i>et al.</i> , 2008; Kolb, 2009 a
Xanthobacteraceae	<i>Ancylobacter dichloromethanicus</i>	+	Firsova <i>et al.</i> , 2009
<b>Bacilli</b>			
Bacillaceae	<i>Bacillus vallismortis</i>	+	Ling <i>et al.</i> , 2011
<b>Betaproteobacteria</b>			
Comamonadaceae	<i>Variovorax paradoxus</i>	+	Anesti <i>et al.</i> , 2005
Burkholderiaceae	<i>Burkholderia xenovorans</i>	kA	Goodfellow und Alderson, 1977; Kolb, 2009 a
Methylophilaceae	<i>Methylophilus glucosoxydans</i>	+	Doronina <i>et al.</i> , 2012 a
Rhodocyclaceae	<i>Methyloversatilis universalis</i>	+	Kalyuzhnaya <i>et al.</i> , 2006; Kolb, 2009 a
-	<i>Methylobium aquaticum</i>	+	Kolb, 2009 a; Song und Cho, 2007
-	<i>Methylobium petroleiphilum</i>	+	Kolb, 2009 a; Nakatsu <i>et al.</i> , 2006
<b>Flavobacteriia</b>			
Flavobacteraceae	<i>Flavobacterium glycinis</i>	+	Madhaiyan <i>et al.</i> , 2010
<b>Gammaproteobacteria</b>			
Enterobacteraceae	<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	Boden <i>et al.</i> , 2008; Kolb, 2009 a
Methylococcaceae	<i>Methylophaga paludis</i>	+	Danilova <i>et al.</i> , 2012
Piscirickettsiaceae	<i>Methylophaga thiooxydans</i>	+	Boden <i>et al.</i> , 2011
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas mendocina</i>	-	Boden <i>et al.</i> , 2008; Kolb, 2009 a
Trichotrichaceae	<i>Beggiatoa alba</i>	kA	Kolb, 2009 a; Vaucher, 1803
Vibrionaceae	<i>Photobacterium indicum</i>	+	Johnson und Weisrock, 1969; Kolb, 2009 a; Xie und Yokota, 2004
-	<i>Methylohalomonas lacus</i>	+	Kolb, 2009 a; Sorokin <i>et al.</i> , 2007

Abkürzungen: +, Wachstum mit Methanol als Substrat; -, kein Wachstum mit Methanol als Substrat oder auf Grund von unsicheren phylogenetischen Modellen keine Zuordnung zu einer Familie (Garriety *et al.*, 2004); kA, Wachstum in Medium mit Methanol wurde nicht getestet.

<sup>a</sup>Besitzt *mxoF*, das für die große Untereinheit der Methanoldehydrogenase kodiert (1.6). Bisher ist nicht bewiesen, dass Wachstum auf Methanol stattfindet.

**Tab. 2:** Ergänzende Liste von gültig beschriebenen Arten, die auf Methanol-haltigem Medium wachsen und nicht in der Publikation von Kolb (Kolb, 2009 a) aufgelistet wurden oder seitdem neu beschrieben wurden.

Klasse/Stamm	Herkunft	Fak	pH	Referenz
<b>Actinobacteria</b>				
<i>Micrococcus luteus</i> MM7	Mundhöhle	+	kA <sup>a</sup>	Anesti <i>et al.</i> , 2005
<b>Alphaproteobacteria</b>				
<i>Ancylobacter dichloromethanicus</i> DM16T	Boden	+	N	Firsova <i>et al.</i> , 2009
<i>Ancylobacter oerskovii</i> NS05	Boden	+	N	Lang <i>et al.</i> , 2008
<i>Ancylobacter polymorphus</i> DSM 2457	Boden	+	N	Xin <i>et al.</i> , 2006
<i>Ancylobacter rudongensis</i> JCM 1167	Rhizosphäre	+	N	Xin <i>et al.</i> , 2004
<i>Ancylobacter vacuolatus</i> DSM 1277	Boden	+	N	Xin <i>et al.</i> , 2006
<i>Methylobacterium bullatum</i> B3.2	Phyllosphäre	+	N	Hoppe <i>et al.</i> , 2011
<i>Methylobacterium cerastii</i> C15	Phyllosphäre	+	Act	Wellner <i>et al.</i> , 2012
<i>Methylobacterium gnaphalii</i> AB627071	Phyllosphäre	+	kA	Tani <i>et al.</i> , 2012 a
<i>Methylobacterium goesingense</i> AY364020	Rhizosphäre	+	N	Idris <i>et al.</i> , 2006
<i>Methylobacterium gossypicola</i> Gh-105	Phyllosphäre	+	N	Madhaiyan <i>et al.</i> , 2012
<i>Methylobacterium longum</i> DSM 23933	Phyllosphäre	+	N	Knief <i>et al.</i> , 2012
<i>Methylobacterium marchantiae</i> DSM 21328	Phyllosphäre	+	N	Schauer <i>et al.</i> , 2011
<i>Methylobacterium oxalidis</i> DSM 24028	Phyllosphäre	+	N	Tani <i>et al.</i> , 2012 b
<i>Methylobacterium phyllosphaera</i> BMB27	Phyllosphäre	+	N	Madhaiyan <i>et al.</i> , 2009 a
<i>Methylocapsa aurea</i> DSM 22158	Boden	+	Act	Dunfield <i>et al.</i> , 2010
<i>Methyloferula stellata</i> AR4	Boden	-	Ac	Vorobev <i>et al.</i> , 2011
<i>Methylopila jiangsuensis</i> DSM 22718	Belebtschlamm	+	N	Li <i>et al.</i> , 2011
<i>Starkeya koreensis</i> Jip08	Phyllosphäre	+	N	Im <i>et al.</i> , 2006
<i>Starkeya novella</i> IAM 12100	Phyllosphäre	+	N	Im <i>et al.</i> , 2006
<b>Bacilli</b>				
<i>Bacillus vallismortis</i> JY3A	Boden	+	N	Ling <i>et al.</i> , 2011
<b>Betaproteobacteria</b>				
<i>Methylobacillus arboreus</i> VKM B-2590	Phyllosphäre	+	N	Gogleva <i>et al.</i> , 2011
<i>Methylobacillus gramineus</i> VKM B-2591	Phyllosphäre	+	N	Gogleva <i>et al.</i> , 2011
<i>Methylopila musalis</i> MUSAT	Bananenfrucht	+	N	Doronina <i>et al.</i> , 2012 b
<i>Methylophilus rhizosphaerae</i> BMB147	Rhizosphäre	+	N	Madhaiyan <i>et al.</i> , 2009 b
<i>Methylophilus glucosoxydans</i> B	Rhizosphäre	+	N	Doronina <i>et al.</i> , 2012 a
<i>Methylophilus flavus</i> DSM 23073	Phyllosphäre	-	N	Gogleva <i>et al.</i> , 2010
<i>Methylophilus luteus</i> DSM 2949	Phyllosphäre	+	N	Gogleva <i>et al.</i> , 2010
<i>Methylothermus versatilis</i> JCM 17579	Sediment	+	N	Kalyuzhnaya <i>et al.</i> , 2012
<i>Methylovorus menthalis</i> DSM 24715	Rhizosphäre	-	Al	Doronina <i>et al.</i> , 2011
<i>Variovorax paradoxus</i> 5KTg	Mundhöhle	+	kA <sup>a</sup>	Anesti <i>et al.</i> , 2005
<b>Flavobacteriia</b>				
<i>Flavobacterium glycines</i> Gm-149	Rhizosphäre	+	N	Madhaiyan <i>et al.</i> , 2010
<b>Gammaproteobacteria</b>				
<i>Methylomonas koyamae</i> MG30	Reisfeldwasser	-	Act	Ogiso <i>et al.</i> , 2012
<i>Methylomonas scandinavica</i> SR5	Grundwasser	-	N	Kalyuzhnaya <i>et al.</i> , 1999
<i>Methylomonas paludis</i> MG30	Torfmoor	-	Act	Danilova <i>et al.</i> , 2012
<i>Methylothermus subterraneus</i> DSM 19750	Aquifer	-	Act	Hirayama <i>et al.</i> , 2011
<i>Methylophaga lonarensis</i> MPL	Sediment	-	Al	Antony <i>et al.</i> , 2012
<i>Methylophaga sulfidovorans</i> RB-1	Sediment	-	N	de Zwart <i>et al.</i> , 1996
<i>Methylophaga thiooxydans</i> DSMO10	Meerwasser	+	kA <sup>a</sup>	Boden <i>et al.</i> , 2010; Boden <i>et al.</i> , 2011

Abkürzungen: Fak, fakultative Methylophilie; +, Wachstum auf Verbindungen mit Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung; -, kein Wachstum auf Verbindungen mit Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung; kA, keine Angaben in der Erstbeschreibung vorhanden; N, neutrophil (Wachstums optimum bei einem pH-Wert zwischen 6,6 und 7,9); Act, acidotolerant (Wachstums optimum bei einem pH-Wert zwischen 3,1 und 6,5); Ac, acidophil (Wachstums optimum bei einem pH-Wert unter 3); Al, alkaliphil (Wachstums optimum bei einem pH-Wert über 8).

<sup>a</sup>Anreicherungen wurden in Medium mit neutralem pH-Wert erhalten

Methylo trope lassen sich nicht nur taxonomisch, sondern auch physiologisch in Gruppen einteilen. Ein Großteil der bekannten methylo trophen Arten ist aerob aber auch einige Anaerobier können Methanol nutzen (Kolb, 2009 a). *Moorella mulderi* oxidiert Methanol mit Thiosulfat als Elektronenakzeptor (Balk *et al.*, 2003) und einige methanogene *Archaea* wie z.B. *Methanosarcina acetivorans* und *Methanobrevibacter smithii* können Methanol zu Methan reduzieren (Penger *et al.*, 2012). Darüber hinaus können einige aerobe Methylo trope wie z.B. *Paracoccus denitrificans* Nitrat als alternativen Elektronenakzeptor nutzen und dementsprechend anaerob auf Methanol wachsen (Bamforth und Quayle, 1978). "*Candidatus Methylo mirabilis oxyfera*" koppelt die Oxidation von Methanol mit einem speziellen Denitrifikationsprozess, bei dem zwei Moleküle Stickstoffmonoxid zu molekularem Distickstoff und molekularem Sauerstoff dismutiert werden. Der Organismus produziert somit selbst molekularen Sauerstoff, der durch das Enzym Methanmonooxygenase genutzt werden kann, um Methan zu Methanol zu oxidieren. "*Candidatus Methylo mirabilis oxyfera*" ist damit streng genommen weder ein typischer aerober Methanoxidierer, noch ein anaerober Methanoxidierer (Ettwig *et al.*, 2010).

Die Gruppe der aeroben, methylo trophen *Bacteria* gliedert sich in Methan-oxidierende Methylo trope (Methanotrophe) und andere Methylo trope, die kein Methan nutzen können. Dabei ist Methanol das C1-Substrat, das von den meisten methylo trophen Arten (88%) genutzt werden kann (Kolb, 2009 a; Tab. 2). Nur etwa 26% der beschriebenen aeroben methylo trophen Arten sind methanotroph (Kolb, 2009 a). Man unterscheidet zwischen Typ I und Typ II methanotrophen *Bacteria*. Methanotrophe des Typs I (z.B. *Methylo monas methanica*) besitzen intrazelluläre Membranstapel, die vertikal zur Cytoplasmamembran ausgerichtet und mit dieser kontinuierlich sind. Typ I Methanotrophe assimilieren Kohlenstoff über den Ribulosemonophosphat (RuBP)-Zyklus (Abb. 2). Methanotrophe des Typs II (z.B. *Methylo sinus trichosporium*) besitzen ein intrazelluläres Membransystem aus paarweise angeordneten peripheren Schichten und assimilieren Kohlenstoff über den Serinweg (Abb. 2) (Chistoserdova *et al.*, 2009; Lawrence und Quayle, 1970; Shishkina *et al.*, 1976; Trotsenko und Murrell, 2008). In den Jahren 2007 und 2008 wurden von drei unabhängigen Arbeitsgruppen erstmals Methan-oxidierende thermoacidophile Isolate der Klasse *Verrucomicrobiae* beschrieben (Dunfield *et al.*, 2007; Islam *et al.*, 2008; Pol *et al.*, 2007). Diese drei Isolate wurden vorläufig als "*Acidimethylo silex fumarolicum* SolV", "*Methylo korus inferorum* V4" und "*Methylo acida kamchatkensis* Kam1" bezeichnet, sind jedoch auf Grund der Ähnlichkeit ihrer 16S rRNA Gensequenz (>98,4%) wahrscheinlich zu einer einzigen Gattung zuzuordnen (Op den Camp *et al.*, 2009). Als Gattungsname wurde "*Methylo acidiphilum*" vorgeschlagen (Op den Camp *et al.*, 2009), bisher aber nicht für gültig erklärt (J.P. Euzéby, List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, Stand April, 2013).

Während der Großteil der methanotrophen Arten obligat methylo troph (also monocarbotroph; de Marco, 2004) lebt, sind 71% der aeroben methylo trophen Arten fakultativ methylo troph (also polycarbotroph; Kolb, 2009 a; Tab. 2). Alternative Substrate sind Mono-, Di- und Polysaccharide, Polyhydroxycarbonsäuren, Polyole, primäre Alkohole, Aminosäuren, Mono-,

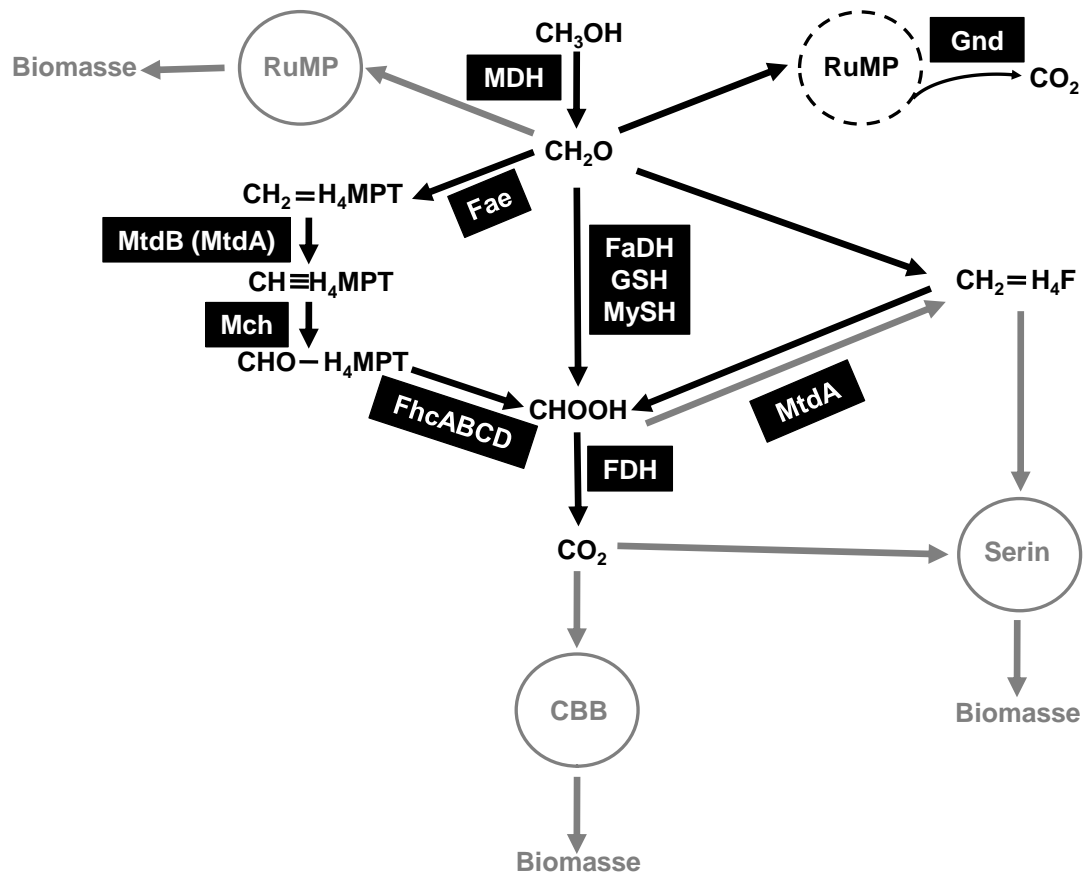
Di- und Tricarbonsäuren, Aromaten und andere stickstoffhaltige und schwefelhaltige Verbindungen (Kolb, 2009 a). Mitglieder der Gattung *Methylobacterium* werden auch als pink-pigmentierte fakultative Methylo trope bezeichnet, denn sie können sowohl auf C1-Verbindungen, als auch auf Verbindungen mit Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung wachsen und weisen eine Pigmentierung durch Carotinoide auf (Green, 2006).

Es gibt Hinweise darauf, dass die Anzahl der fakultativen methylo trophen Arten bis heute unterschätzt wird. Gewöhnlich werden bei der Beschreibung neuer Bakterienarten Zucker und Aminosäuren, oft aber nicht Methanol als Substrate getestet. So wurde z.B. *Variovorax paradoxus* im Jahr 1991 beschrieben (Willems *et al.*, 1991) doch es wurde erst 14 Jahre später gezeigt, dass diese Art methylo troph auf Medium mit Methanol wachsen kann (Anesti *et al.*, 2005).

Mit erhöhtem Kultivierungsaufwand steigt auch die Ausbeute an Organismen, die auf Methanol als einziger Kohlenstoff und Energiequelle wachsen (Boden *et al.*, 2008; Moosvi *et al.*, 2005). Des Weiteren wurde durch Versuche mit stabilen Methanolisotopen an komplexen Bodengemeinschaften neue potenzielle methylo trope Arten identifiziert (Radajewski *et al.*, 2002). In Anreicherungen mit  $^{13}\text{C}$ -Methan oder  $^{13}\text{C}$ -Methanol konnte die Inkorporation des stabilen Kohlenstoffisotops in Nukleinsäuren von Vertretern der *Cytophagales* und *Acidobacterium* nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Studie müssen jedoch mit Vorsicht betrachtet werden, denn es ist prinzipiell möglich, dass nicht-methylo trope Organismen Nebenprodukte des Stoffwechsels von Methylo trophen assimilieren. Bisher fehlt der Beweis, dass Methylo trophie innerhalb der Gruppen *Cytophagales* und *Acidobacterium* tatsächlich vorkommt (Radajewski *et al.*, 2002).

## 1.7 Methanol-abhängiger Metabolismus methylotropher *Bacteria*

Der Methanol-abhängige Metabolismus methylotropher *Bacteria* kann wie folgt in mehrere Stoffwechselmodule untergliedert werden: die dissimilatorische Oxidation von Methanol zu Formaldehyd, die dissimilatorische Oxidation von Formaldehyd zu  $\text{CO}_2$  und die Assimilation von Formaldehyd oder N5,N10-Methylen-Tetrahydrofolat und  $\text{CO}_2$  oder  $\text{CO}_2$  durch den Ribulose-Monophosphat (RuMP)-Zyklus, den Serin-Zyklus oder den Calvin-Benson-Bassham-Zyklus (CBB-Zyklus) (Abb. 2) (Chistoserdova, 2011).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung des Methanol-abhängigen Metabolismus von methylotrophen *Bacteria*.  $\text{CH}_2=\text{H}_4\text{MPT}$ , N5,N10-Methylen-Tetrahydromethanopterin;  $\text{CH}\equiv\text{H}_4\text{MPT}$ , N5,N10-Methenyl-Tetrahydromethanopterin;  $\text{CHO}-\text{H}_4\text{MPT}$ , N5-Formyl-Tetrahydromethanopterin;  $\text{CH}_2=\text{H}_4\text{F}$ , N5,N10-Methylen-Tetrahydrofolat; CBB, Calvin-Benson-Bassham-Zyklus; FaDH, Formaldehyddehydrogenase; Fae, Formaldehyd-aktivierendes Enzym; FDH, Formiatdehydrogenase; FhcABCD, Formyltransferase/Hydrolase Komplex; Gnd, 6-Phosphogluconatdehydrogenase; GSH, Glutathion-abhängige Formaldehyddehydrogenase; Mch, Methenyl- $\text{H}_4\text{MPT}$  Cyclohydrolase; MDH, Methanoldehydrogenase; Mtd, Methylen- $\text{H}_4\text{MPT}$  Dehydrogenase; MySH, Mycothiol-abhängige Formaldehyddehydrogenase; RuMP, Ribulosemonophosphat-Zyklus; Schwarze Pfeile, Dissimilationsreaktionen; Graue Pfeile, Assimilationsreaktionen; Gestrichelter Kreis, Formaldehydoxidation mittels Enzymen des RuMP-Zyklus und Gnd; Graue Kreise, Assimilationszyklen; modifiziert nach Chistoserdova, 2011.

### 1.7.1 Oxidation von Methanol zu Formaldehyd

Im ersten Schritt der Dissimilation wird Methanol mit Hilfe einer Methanoldehydrogenase (MDH) zu Formaldehyd oxidiert (Abb. 2). Eine Pyrrolochinolinchinon (PQQ)-abhängige MDH (PQQ-MDH) wurde erstmals im Periplasma von *Methylobacterium extorquens* AM1 nachgewiesen und ist in gramnegativen Methyilotrophen verbreitet (Anthony, 1982; Anthony, 2004; Chistoserdova, 2011). Es handelt sich um ein Heterotetramer aus zwei großen Alpha- (76 kDa) und zwei kleinen Beta-Untereinheiten (8,5 kDa). Die Untereinheiten werden durch die Gene *mxoA* kodiert. Jede Alpha-Untereinheit bildet einen achtfachen Propeller. Jedes Propellerblatt besteht aus einem viersträngigem, antiparallelem Beta-Faltblatt. Die Beta-Untereinheiten bilden alpha-helikale Strukturen außerhalb der eigentlichen MDH. Ihre Funktion ist bisher unbekannt. Die prosthetische Gruppe PQQ befindet sich zusammen mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion in einem zentralen Kanal des scheibenförmigen Proteins (Anthony und Williams, 2003; Trotsenko und Murrell, 2008; White *et al.*, 1993).

Die Methanoloxidation durch die MDH ist an eine Elektronentransportkette gekoppelt. An der inneren cytoplasmatischen Membran entsteht ein Protonengradient, der die ATP-Synthese mittels ATP-Synthase ermöglicht. Durch die Oxidation von Methanol zu Formaldehyd im Periplasma wird PQQ zu PQQH<sub>2</sub> reduziert. Anschließend werden zwei Elektronen über die Cytochrome  $c_{551}$  ( $c_L$ ),  $c_{550}$  ( $c_n$ ) und  $c_{552}$  auf eine terminale Oxidase mit den Cytochromen aa3 im Cytoplasma transportiert. Diese terminale Oxidase reduziert molekularen Sauerstoff zu Wasser (Sokolov *et al.*, 1981; Trotsenko und Murrell, 2008). Durch die Regeneration von PQQ aus PQQH<sub>2</sub> und die Übertragung der Elektronen auf die Cytochrome kommt es zur Ansäuerung des Periplasmas. Gleichzeitig werden im Cytoplasma bei der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser Protonen verbraucht. Das Cytoplasma ist damit insgesamt alkalischer und elektronegativer als das Periplasma. Die resultierende protonenmotorische Kraft ist die treibende Kraft für die oxidative Phosphorylierung durch ATP-Synthasen (Mitchell, 1961; Sapro *et al.*, 2003). Pro Molekül Methanol wird etwa ein Molekül ATP gebildet (Dijkstra *et al.*, 1989).

In einigen Studien zur Diversität von Methyilotrophen wurde *mxoA* als funktioneller Genmarker analysiert (z.B. Henckel *et al.*, 2000). *mxoA* kommt vor allem in *Proteobacteria* vor. Durch die Analyse dieses Genmarkers kann folglich nicht die gesamte methyilotrophe Artenvielfalt detektiert werden (Chistoserdova *et al.*, 2009). Einige methyilotrophe Vertreter der Ordnungen *Burkholderiales* und *Rhodocyclales* nutzen MDH2 (Kalyuzhnaya *et al.*, 2008), ein Methanol-oxidierendes Enzym, das aus einer einzigen Untereinheit besteht. Die Aminosäuresequenz der Untereinheit ist weniger als 35% identisch zu der Aminosäuresequenz von MxoA (Kalyuzhnaya *et al.*, 2008). Grampositive Methyilotrophe wie *Bacillus methanolicus* (Arfman *et al.*, 1991; Arfman *et al.*, 1997; Vonck *et al.*, 1991) und *Amycolatopsis methanolica* (Bystrykh *et al.*, 1993) besitzen sogar keine PQQ-abhängige Methanoldehydrogenase. Bei der MDH von grampositiven Methyilotrophen handelt es sich um ein NAD(P)-bindendes Homodekamer ohne Homologie zu der PQQ-MDH

(Arfman *et al.*, 1997). Das 490 bis 500 kDa große Protein weist eine Fünffachsymmetrie auf und enthält  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen (Bystrykh *et al.*, 1993).

Die Rolle des Proteins XoxF und seine potenzielle Funktion als alternative MDH in gramnegativen Methyloproten wird derzeit diskutiert. *xoxF* wurde im Genom aller bisher charakterisierten Methyloproten, aber auch in vielen Genomen von Nicht-Methyloproten, darunter einige tief abzweigende Phyla wie z.B. die *Aquificales* und *Acidobacteria*, nachgewiesen (Chistoserdova, 2011). In vielen Genomen von Methyloproten kommen mehrere *xoxF*-Gene vor. XoxF kann *in vitro* Methanol oxidieren und ist auf Aminosäurelevel zu etwa 50% identisch mit MxaF (Schmidt *et al.*, 2010). Die Deletion von *xoxF* in Organismen mit *mxoF* oder *mdh2* hat lediglich geringe Auswirkungen auf den Phänotyp (Chistoserdova und Lidstrom, 1997; Chistoserdova, 2011; Harms *et al.*, 1996; Kalyuzhnaya *et al.*, 2008). Eine Überexpression von *xoxF* in *mxoF*-Deletionsmutanten von *Methylobacterium extorquens* AM1 erlaubt kein Wachstum auf Methanol (Nunn und Lidstrom, 1986; Schmidt *et al.*, 2010). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Hauptfunktion von XoxF in Methyloproten möglicherweise nicht die Oxidation von Methanol ist. Die MxaF-Konzentration in *Methylobacterium extorquens* Mutanten ohne funktionsfähiges *xoxF* ist reduziert (Skovran *et al.*, 2011). Es wird vermutet, dass XoxF an der Regulation der Expression der PQQ-abhängigen MDH beteiligt ist (Skovran *et al.*, 2011). Die Funktion von XoxF in nicht-methyloproten *Bacteria* ist derzeit nicht bekannt. In nicht-methyloproten *Burkholderia xenovorans* Stämmen wird die Expression von *xoxF* durch nährstoffarme Bedingungen induziert (Chistoserdova, 2011; Denef *et al.*, 2005). In nährstoffarmen Küstengewässern ist XoxF eines der häufigsten Proteine (Chistoserdova, 2011; Sowell *et al.*, 2011). Es ist vorstellbar, dass XoxF unter nährstoffarmen Bedingungen zur Oxidation von Methanol genutzt wird. Beweise für eine solche Funktion fehlen jedoch bis heute (Chistoserdova, 2011).

### 1.7.2 Oxidation von Formaldehyd zu $\text{CO}_2$

Die meisten Methyloproten besitzen mehr als einen metabolischen Weg, um Formaldehyd zu Formiat zu oxidieren. Die Oxidation von Formaldehyd ist nicht nur ein wichtiger Schritt zur Energiekonservierung, sondern ist auch ein möglicher Weg der Entgiftung. Formaldehyd ist toxisch und kann Proteine denaturieren (Feldman, 1973; Chistoserdova, 2011; Vorholt *et al.*, 2000). Wege zur Formaldehydoxidation kommen daher auch in nicht methyloproten Organismen vor (Chistoserdova, 2011).

Der Tetrahydromethanopterin ( $\text{H}_4\text{MPT}$ )-abhängige Weg ist nicht nur der meistverbreitete Formaldehydoxidationsweg innerhalb der Methyloproten (Chistoserdova *et al.*, 2009), sondern gilt auch als das meist verbreitete metabolische Modul innerhalb dieser funktionellen Gruppe (Chistoserdova, 2011). Diversitätsstudien, die auf Genen des  $\text{H}_4\text{MPT}$ -abhängigen Weges basieren, detektieren eine breite phylogenetische Vielfalt an Methyloproten. Es wird vermutet, dass viele bisher nicht identifizierte Phyla mit Hilfe von Genmarkern dieses



Stoffwechselweges nachgewiesen werden können (Chistoserdova, 2011). Der  $H_4$ MPT-abhängige Formaldehydoxidations-Weg hat sich wahrscheinlich schon relativ früh in der Evolution entwickelt (Chistoserdova *et al.*, 2004; Chistoserdova *et al.*, 2005). Schlüsselgene dieses Stoffwechselweges findet man unter anderem in *Methylobacterium extorquens* und in *Hyphomicrobium denitrificans* aber auch in nicht methylo trophen *Proteobacteria*, in den meisten *Planctomycetes* und in einigen *Synergistetes* wie *Anaerobaculum hydrogeniformans*. Des Weiteren enthalten die Genome einiger methanogener und Sulfat-reduzierender *Archaea* Gene dieses Stoffwechselwegs (Chistoserdova, 2011).

Die Kondensation von Formaldehyd mit dem Cofaktor  $H_4$ MPT wird durch das Formaldehyd-aktivierende Enzym (Fae) initiiert. Dabei entsteht N5,N10-Methylen- $H_4$ MPT (Abb. 2). Fae ist ein homotrimeres Enzym ohne prosthetische Gruppe. Eine Fae-Untereinheit ist 18 kDa groß (Trotsenko und Murrell, 2008; Vorholt, 2002). *fae*-Mutanten sind sensibler gegenüber Formaldehydtoxizität und verlieren ihre Fähigkeit auf Methanol zu wachsen (Vorholt *et al.*, 2000). In vielen Genomen von Methylo trophen wie z.B. *Methylobacillus flagellatus* (Chistoserdova *et al.*, 2007) oder *Methylobacterium extorquens* (Vuilleumier *et al.*, 2009) werden mehrere *fae*-homologe Gene kodiert (Chistoserdova, 2011). Die Funktion der homologen Gene ist bisher unbekannt. In Deletionsmutanten von *Methylobacterium extorquens* AM1, deren *fae*-homologen Gene (*fae2*, *fae3*) defekt waren, konnte keine Änderung des Phänotyps beim Wachstum auf Methanol beobachtet werden (Kalyuzhnaya *et al.*, 2005 a). *fae3* wurde in allen bisher sequenzierten Genomen von *Planctomycetes* nachgewiesen. Zwei weitere *fae*-Homologe, *fae4* und *fae5* wurden in einigen *Proteobacteria* und grampositiven *Bacteria* identifiziert (Chistoserdova, 2011).

Nach initialer Aktivierung des  $H_4$ MPT-abhängigen Formaldehydoxidationsweges mit Hilfe von Fae, wird N5,N10-Methylen- $H_4$ MPT mit Hilfe einer NADP-abhängigen Methylen- $H_4$ MPT Dehydrogenase (Mtd) zu N5,N10-Methenyl- $H_4$ MPT oxidiert (Abb. 2) (Chistoserdova, 2011). In *Methylobacterium extorquens* wurden bisher zwei verschiedene Methylen- $H_4$ MPT-abhängige Dehydrogenasen identifiziert. MtdA, die auch die reversible Oxidation von N5,N10-Methylen-Tetrahydrofolat ( $H_4$ F) im  $H_4$ F-abhängigen Weg der Formaldehydoxidation katalysiert und MtdB, die spezifisch für den  $H_4$ MPT-abhängigen Weg ist (Hagemeyer *et al.*, 2000). Die Sequenzen von MtdA und MtdB zeigen keine Ähnlichkeit zu der Sequenz Mtd von methanogenen und sulfatreduzierenden *Archaea*. Das archaeelle Enzym bindet im Gegensatz zur der bakteriellen Variante den Cofaktor F420 (Vorholt, 2002).

Im dritten Schritt des  $H_4$ MPT-abhängigen Formaldehydoxidationsweges wird N5,N10-Methenyl- $H_4$ MPT durch das Enzym Methenyl- $H_4$ MPT Cyclohydrolase (Mch) zu N5-Formyl- $H_4$ MPT hydrolysiert (Abb. 2). Das Enzym ist monofunktionell und hat keine prosthetische Gruppe (Chistoserdova *et al.*, 1998). Mch von *Methylobacterium extorquens* AM1 und Mch von *Archaeoglobus fulgidus* zeigen eine Sequenzidentität von 35% (Vorholt, 2002; Chistoserdova *et al.*, 1998). Die Molekularmassen von Mch-Enzymen aus aeroben Methylo trophen und *Archaea* sind zueinander ähnlich. Eine Untereinheit ist etwa 33 kDa groß (Vorholt *et al.*, 1999).

Im letzten Schritt des H<sub>4</sub>MPT-abhängigen Formaldehydoxidationsweges bildet der Formyltransferase/Hydrolase Komplex aus N<sup>5</sup>-Formyl-H<sub>4</sub>MPT Formiat (Abb. 2). Der Formyltransferase/Hydrolase Komplex in *Methylobacterium extorquens* besteht aus vier verschiedenen Untereinheiten, FhcABCD. FhcD zeigt auf Ebene der Aminosäuresequenz eine 40%ige Sequenzidentität zu der Formyltransferase von methanogenen und sulfatreduzierenden *Archaea* (Vorholt, 2002). Die anderen Untereinheiten, FhcABC, zeigen eine Sequenzidentität zu den Untereinheiten der Formyl-Methanofuran-Dehydrogenasen von methanogenen *Archaea* (Chistoserdova, 2011; Vorholt, 2002).

Möglicherweise spielt in einigen methylo trophen Organismen ein anderes C<sub>1</sub>-Transfersystem, der oxidative H<sub>4</sub>F-abhängige Weg, bei der Formaldehydoxidation eine Rolle (Abb. 2). Der oxidative H<sub>4</sub>F-abhängige Weg scheint weniger spezifisch für Methylo trophe zu sein als der H<sub>4</sub>MPT-abhängige Weg. Er ist weit verbreitet innerhalb der *Bacteria* und *Eukarya* und kommt auch innerhalb der *Archaea* vor. Eine zusätzliche Funktion von H<sub>4</sub>F-abhängigen Enzymen in Methylo trophen könnte es sein, Intermediate für die Assimilation von Kohlenstoff über den Serin-Zyklus bereitzustellen (Abb. 2) (Vorholt, 2002).

Für den H<sub>4</sub>MPT-abhängigen Weg und den H<sub>4</sub>F-abhängigen Weg zur Oxidation von Formaldehyd zu Formiat werden mehrere Enzyme benötigt. Neben diesen beiden Wegen gibt es Formaldehydoxidationssysteme, die auf einem einzigen Enzym basieren. Einige grampositive Methylo trophe wie z.B. *Amycolatopsis methanolica* nutzen Mycothiol-abhängige Dehydrogenasen (MySH) zur Formaldehydoxidation (Vorholt, 2002; Chistoserdova, 2011) (Abb. 2). Ein weiterer Weg zur Formaldehydoxidation in Methylo trophen ist abhängig von Glutathion (GSH) (Abb. 2). Man findet ihn z.B. in autotrophen Methylo trophen wie *Paracoccus denitrificans* und *Rhodobacter sphaeroides* (Barber und Donohue, 1998; Chistoserdova, 2011; Ras *et al.*, 1995). Die NAD-abhängige Formaldehyddehydrogenase (FaDH) kommt in einigen methylo trophen aber auch in vielen nicht methylo trophen Organismen wie z.B. *Pseudomonas putida* vor und dient hier der Entgiftung (Chistoserdova, 2011; Tanaka *et al.*, 2003). Bei allen bisher betrachteten Wegen zur Formaldehydoxidation entsteht Formiat, das dann mittels Formiatdehydrogenasen (FDHs) zu CO<sub>2</sub> oxidiert wird (Abb. 2). Methylo trophe können mehrere FDHs kodieren. *Methylobacterium extorquens* besitzt vier verschiedene FDHs. Die FDHs der Methylo trophen sind nicht gut konserviert. FDH-Gene eignen sich daher nicht als funktionelle Marker in Diversitätsstudien (Chistoserdova, 2011).

Alle bisher genannten Wege zur Formaldehydoxidation sind linear. Einige Methylo trophen wie z.B. *Methylobacillus flagellatus* haben jedoch die Möglichkeit Formaldehyd mit Hilfe von Enzymen des RuMP-Zyklus und einer 6-Phosphogluconatdehydrogenase (Gnd) zu CO<sub>2</sub> zu oxidieren (Chistoserdova *et al.*, 2000; Chistoserdova, 2011; Hanson und Hanson, 1996) (Abb. 2). Formaldehyd reagiert mit Ribulose-5-Phosphat zu Hexulose-6-Phosphat, das dann zu Fructose-6-Phosphat isomerisiert wird. Fructose-6-Phosphat wird zu Glucose-6-Phosphat umgewandelt und anschließend zu 6-Phosphogluconat oxidiert. Aus 6-Phosphogluconat wird

mit Hilfe der 6-Phosphogluconatdehydrogenase  $\text{CO}_2$  und Ribulose-5-Phosphat gebildet und der Zyklus kann erneut ablaufen (Chistoserdova *et al.*, 2000; Hanson und Hanson, 1996).

### 1.7.3 Kohlenstoffassimilation

Im methylo trophen Stoffwechsel sind verschiedene Strategien (RuMP-Zyklus, Serin-Zyklus, CBB-Zyklus) verwirklicht, die es erlauben, aus C1-Verbindungen Kohlenstoffverbindungen zu synthetisieren, die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen beinhalten. Die Assimilation im RuMP-Zyklus erfolgt auf der Oxidationsstufe von Formaldehyd (Abb. 2). Aus drei Molekülen Formaldehyd wird unter ATP-Verbrauch ein Molekül Glycerinaldehyd-3-Phosphat gebildet. Dieser Assimilationsweg ist speziell in Methylo trophen verbreitet. Die Schlüsselenzyme Hexulosephosphat-Synthase und Hexulosephosphat-Isomerase kommen jedoch auch in polycarbotrophen Aerobiern wie z.B. in *Escherichia* oder einigen *Archaea* vor, die C1-Verbindungen nicht nutzen können. Dort werden sie für Entgiftungsreaktionen benötigt (Chistoserdova, 2011; Kato *et al.*, 2006).

Im Serin-Zyklus werden Methylen- $\text{H}_4\text{F}$  und  $\text{CO}_2$  assimiliert um Acetyl-CoA zu bilden (Abb. 2). Hierzu sind zwei Moleküle NADH und zwei Moleküle ATP nötig. In einem ersten Schritt wird Methylen- $\text{H}_4\text{F}$  an Glyoxylat gebunden und es entsteht Serin. Glyoxylat muss mittels Ethylmalonyl-CoA-Weg oder Glyoxylat-Zyklus regeneriert werden, damit der Serin-Zyklus erneut ablaufen kann (Chistoserdova *et al.*, 2009; Erb *et al.*, 2007; Peyraud *et al.*, 2009). Der Serin-Zyklus ist charakteristisch für den methylo trophen Stoffwechsel (Chistoserdova, 2011).

Einige Methylo trope besitzen einen funktionellen CBB-Zyklus und können  $\text{CO}_2$  assimilieren (Abb. 2). Dazu gehören einige *Methylococcaceae*, Mitglieder der *Alphaproteobacteria* wie *Paracoccus denitrificans*, aber auch die methanotrophen *Verrucomicrobiae* und anaerobe Methantrophe des NC10 Phylums (Chistoserdova, 2011).

## 1.8 Ökologische Nischen methylo tropher Prokaryoten

Die ökologische Nische einer Art ist der Wertebereich von biotischen und abiotischen Faktoren, in dem die Art leben und sich reproduzieren kann. Arten können sich auf eine bestimmte ökologische Nische spezialisieren. Man spricht dann von Einnischung (Hutchinson, 1957). Ein Großteil der Erkenntnisse über ökologischen Nischen von Methylo trophen wurde anhand von Studien mit Methanotrophen gewonnen (z.B. Knief *et al.*, 2003; Knief und Dunfield, 2005). Über die Einnischung von Methanol-oxidierenden Methylo trophen ist nur wenig bekannt. Es ist vorstellbar, dass Nischen-definierende Faktoren von Methanotrophen und Methanol-oxidierenden Methylo trophen überlappen.

### 1.8.1 Substrate

Die Einnischung von Methyлотроphen könnte durch die Verfügbarkeit von Kohlenstoffverbindungen in der Umwelt beeinflusst werden. 75% der methyлотроphen Arten, die bislang aus Böden isoliert wurden, sind fakultativ methyлотroph, also polycarbotroph (Kolb, 2009 a; Tab. 2). Die Hauptquelle von organischem Kohlenstoff in Böden ist Pflanzenmaterial. Absterbende Pflanzenreste werden durch Mikroorganismen im Boden über komplexe trophische Beziehungen abgebaut. Im Boden gespeicherter Kohlenstoff ist abhängig von Veränderungen der Vegetation wie z.B. der Entfernung von pflanzlicher Biomasse, von der mechanischen Störung der Bodenstruktur, vom Stickstoffeintrag und von der globalen Erwärmung (Janssens *et al.*, 2010; Schrumpf *et al.*, 2011). Boden ist damit ein dynamischer Kohlenstoffspeicher (Schrumpf *et al.*, 2011). Fakultative Methyлотrophe, die ein großes Substratspektrum nutzen (1.6), könnten einen Selektionsvorteil gegenüber obligaten Methyлотроphen haben.

Nicht nur die Art der Substrate, sondern auch die Substratkonzentration könnte ein Nischendefinierender Faktor von Methyлотроphen sein (Kolb, 2009 a). Einige Isolate wie z.B. Vertreter der Gattung *Methylocystis* sind in Bezug auf die Methankonzentration oligotropher als andere Isolate wie z.B. *Methylocapsa acidiphila* (Knief und Dunfield, 2005). In Versuchen mit Mikrokosmen veränderte sich die Gemeinschaft der aktiven Methanotrophen wenn die Methankonzentration erhöht wurde (Knief *et al.*, 2006). Es liegt nahe, dass auch die Methanolkonzentration die Diversität der Methyлотроphen im Boden beeinflusst. *Methylocella tundrae* nutzt Methanolkonzentrationen im Bereich von 2,5 mM bis 500 mM. Die optimale Methanolkonzentration liegt bei 120 mM bis 250 mM (Dedysh *et al.*, 2004 a). Die maximale Wachstumsrate des methyлотроphen Isolates BIP wird bei 31 mM erreicht (Chongcharoen *et al.*, 2005). Andere Methyлотrophe können möglicherweise niedrigere Methanolkonzentrationen nutzen. Der  $K_m$ -Wert der MDH von *Hyphomicrobium denitrificans* liegt bei 3 bis 10,5  $\mu$ M (Nojiri *et al.*, 2006). Es ist möglich, dass die Methanolkonzentration ein Selektionsfaktor für bestimmte methyлотrophe Gruppen ist. Ab einer bestimmten Konzentration ist Methanol toxisch für Methyлотrophe. Durch die Zugabe von Methanol (0,8 M) kommt es in Kulturen von *Methylovorus* sp. DSM 11726 zur verstärkten Ausbildung von Hitzeschockproteinen, die typisch für eine Stressantwort sind (Park *et al.*, 2001). Es wird geschätzt, dass ab etwa 3 M Methanol keine Biodegradation mehr auftritt (Smith *et al.*, 2002). Möglicherweise ist die Konzentration, ab der Methanol toxisch für Methyлотrophe wirkt, nicht bei allen Methyлотроphen gleich. Methyлотrophe *Bacillus*-Spezies können ungünstige Umweltbedingungen durch die Ausbildung von Sporen überdauern. In Batch-Kulturen erfolgte die vollständige Sporulation jedoch nur dann, wenn Glucose und nicht Methanol als Substrat zugesetzt wurden (Al-Awadhi *et al.*, 1988). Allgemein ist bekannt, dass Alkohole bereits in geringen, für vegetative Zellen nicht schädlichen Konzentrationen die Sporulation inhibieren können (Gottig *et al.*, 2005). Substrate im Boden könnten daher die Möglichkeit zur Überdauerung von Stressphasen beeinflussen.

### 1.8.2 Sauerstoff

Die Sauerstoffverfügbarkeit könnte die Einnischung von methylo trophen *Bacteria* beeinflussen, denn Sauerstoff ist ein wichtiger terminaler Elektronenakzeptor (Kolb, 2009 a). Die meisten aeroben Methanol-oxidierenden *Bacteria* bevorzugen sauerstoffgesättigte Bedingungen (Kolb, 2009 a). Aber es wurden auch mikroaerophile Arten wie *Methylomonas difficile* (Rahalkar *et al.*, 2007) beschrieben. Fakultativ aerobe Arten innerhalb der Gattungen *Hyphomicrobium* und *Paracoccus* können z.B. Nitrat als Elektronenakzeptor nutzen (Kolb, 2009 a) (1.6). Einige Methylo trope können somit auch unter anoxischen Bedingungen aktiv bleiben. Generell gilt, dass Sauerstoff der bevorzugte Elektronenakzeptor ist, da durch die aerobe Atmung mehr Energie konserviert werden kann als durch anaerobe Stoffwechselprozesse (Krekeler und Cypionka, 1995; Schink, 2005). Fakultativ aerobe Arten könnten einen Selektionsvorteil beim Wechsel von oxischen zu anoxischen Bedingungen in Wäldern und Grünländern haben. In oxischen Böden ist die Sauerstoffkonzentration dynamisch. Heftige Regenereignisse erhöhen die Wassersättigung des Bodens. Der Sauerstoff im Bodenwasser wird durch aerobe Atmung abgebaut. Aufgrund der geringeren Diffusionsgeschwindigkeit von Sauerstoff in Wasser als in Luft entstehen anoxische Zonen (Liptzin *et al.*, 2011).

Sauerstoff kann in seiner Rolle als terminaler Elektronenakzeptor das Wachstum von aeroben Methylo trophen fördern, aber andererseits auch inhibitorisch auf bestimmte diazotrophe Methylo trophen wirken. Die stickstofffixierenden Enzyme, die Nitrogenasen, einiger Methylo trophen sind extrem sauerstoffempfindlich (Dalton und Whittenbury, 1976; Khadem *et al.*, 2010). Die Stickstofffixierung von *Methylococcus capsulatus* und *Methylobacter luteus* findet nur bei relativ geringen Sauerstoffkonzentrationen (unter 10% v/v) statt (Dedysh *et al.*, 2004 b; Khadem *et al.*, 2010; Murrell und Dalton, 1983). Im Gegensatz dazu können die methanotrophen Arten *Methylocapsa acidiphila* und *Methylosinus trichosporium* Stickstoff bei höheren Sauerstoffkonzentrationen (15% v/v und 20% v/v) fixieren (Dedysh *et al.*, 2002; Dedysh *et al.*, 2004 b; Khadem *et al.*, 2010).

### 1.8.3 Stickstoff

Die Einnischung der Methylo trophen im Boden könnte von der Stickstoffverfügbarkeit beeinflusst werden. Methylo trope müssen Stickstoff assimilieren, um stickstoffhaltige organische Verbindungen aufzubauen. Die meisten methylo trophen Arten assimilieren Nitrat und Ammonium (Kolb, 2009 a). Nitrat im Boden ist aber nicht nur als externe Stickstoffquelle von Bedeutung, sondern kann unter anoxischen Bedingungen auch ein wichtiger Elektronenakzeptor für fakultativ aerobe Methylo trope sein (Kolb, 2009 a) (1.8.2). Einige Methylo trope können Harnstoff oder Aminosäuren als Stickstoffquellen nutzen (Bowman, 2000; Whittenbury *et al.*, 1970). Des Weiteren existieren stickstofffixierende Arten wie z.B. *Methylocapsa acidiphila* (Dedysh *et al.*, 2002). Es ist vorstellbar, dass diazotrophe, Methanol-oxidierende Methylo trope unter stickstofflimitierten Bedingungen gegenüber nicht-

diazotrophen Arten einen Vorteil haben. Aber auch in landwirtschaftlich genutzten Böden mit hohem Stickstoffeintrag könnten diazotrophe Arten profitieren, denn Methylo trope konkurrieren hier mit anderen Bodenorganismen um externe Stickstoffquellen (Bodelier und Laanbroek, 2004).

#### 1.8.4 pH-Wert

Ein Einfluss des *in situ* pH-Wertes auf Methanol-oxidierende Methylo trope in Böden ist wahrscheinlich. 79% der Methanol-oxidierenden Bakterienarten, die aus Böden isoliert wurden, sind neutrophil (Kolb, 2009 a; Tab. 2). 21% der Methanol-oxidierenden Bakterienarten, die aus Böden isoliert wurden sind acidophil, alkaliphil oder acidotolerant (Kolb, 2009 a; Tab. 2). Im Allgemeinen liegt der pH-Bereich, in dem neutrophile *Bacteria* wachsen können, zwischen 5,5 und 9,0. Der intrazelluläre pH-Wert von neutrophilen *Bacteria* liegt zwischen 7,5 und 7,7 (Krulwich *et al.*, 2011; Padan *et al.*, 2005; Slonczewski *et al.*, 2009). pH-Werte außerhalb des Wachstumsbereiches können teilweise toleriert werden, um wechselnde Umweltbedingungen zu überdauern. Jeder Boden hat natürlicherweise eine gewisse Pufferkapazität. Der pH-Wert von Böden kann sich jedoch z.B. durch Bewirtschaftung verändern. So entstehen unter anderem bei der Nitrifikation nach Anwendung von ammoniumhaltigen Düngemitteln Protonen. Außerdem führt die Entfernung der Vegetation bei der Ernte zur verstärkten Freisetzung von Protonen aus organischer Bodensubstanz (Rowell, 1994).

Generell müssen bakterielle Zellen eine pH-Homöostase aufrechterhalten, denn die Funktion von Proteinen ist nur in einem bestimmten pH-Bereich gewährleistet. Des Weiteren ist die Energiegewinnung von Mikroorganismen abhängig von einem Protonengradienten über die bakterielle Zellmembran (Krulwich *et al.*, 2011). Strategien um den intrazellulären pH-Wert auch bei wechselnden pH-Bedingungen in einem engen Bereich zu halten sind z.B. der aktive Transport von Protonen über die Cytoplasmamembran und die Produktion von Enzymen (z.B. Hydrogenasen), die durch ihre Reaktionen cytoplasmatische Protonen verbrauchen (Krulwich *et al.*, 2011). Eine weitere Anpassung an saure Umweltbedingungen ist die veränderte Membrandurchlässigkeit für Protonen (Krulwich *et al.*, 2011; Op den Camp *et al.*, 2009). Die acidophilesten bisher bekannten Methanotrophen gehören zur Klasse *Verrucomicrobiae* (1.6) und können noch bei einem pH-Wert unter 1 wachsen (Op den Camp *et al.*, 2009). Die Zellmembran der *Verrucomicrobiae*-zugehörigen Isolate Kam1 und SolV hat im Vergleich zu nicht-acidophilen Methanotrophen einen erhöhten Gehalt an gesättigten Fettsäureresten. Die Membrandurchlässigkeit für Protonen wird so vermindert (Op den Camp *et al.*, 2009).

### 1.8.5 Temperatur

Die Bodentemperatur könnte ein wichtiger Faktor bei der Einnischung von methylo trophen *Bacteria* sein, denn methylo trophe Arten haben verschiedene Temperaturoptima. *Methylobacterium soli* wächst bei Temperaturen von 4-37°C und ist mesophil (Cao *et al.*, 2011). „*Methylacidiphilum infernorum*“ hat ein Temperaturoptimum bei 60°C und ist thermophil (Hou *et al.*, 2008). Hohe Temperaturen können Proteine und Nukleinsäuren denaturieren und die Membranstabilität beeinflussen (Ferrera und Reysenbach, 2007). Thermophile Mikroorganismen sind z.B. durch einen erhöhten Anteil an gesättigten Fettsäuren in der Membran an hohe Temperaturen angepasst (Ferrera und Reysenbach, 2007). Die Erhöhung der Inkubationstemperatur einer *Methylovorus*-Kultur von 30°C auf 40°C führte zur Ausbildung von Hitzeschockproteinen wie z.B. GroEL-ähnlichen Proteinen, die als Chaperone die korrekte Faltung von Proteinen beschleunigen (Park *et al.*, 2001). Die Fähigkeit zur Stress-Antwort bei schwankenden Bodentemperaturen könnte ein entscheidender Vorteil für bestimmte methylo trophe Gruppen sein.

An methanotrophen Lebensgemeinschaften wurde gezeigt, dass die Bodentemperatur das Oxidationspotenzial von Methan beeinflusst (Kolb, 2009 a). Methanoxidation wurde in Mikrokosmen mit Reisfeldboden bei 15°C nicht aber bei 5°C nachgewiesen. In Mikrokosmen mit Waldboden wurde Methan auch bei 5°C oxidiert (Mohanty *et al.*, 2007). In Böden von alpinen Weiden stieg die Methanoxidationsrate mit steigender Bodentemperatur zusammen mit der Zellzahl der Methanotrophen. Gleichzeitig sank die Bodenfeuchte (Zheng *et al.*, 2012). Der Wassergehalt des Bodens reguliert den Transport von Methan und Sauerstoff (Urmann *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2012). Eine Erhöhung der Bodentemperatur könnte den Wassergehalt des Bodens vermindern und zu einer erhöhten Methan- und Sauerstoffkonzentration führen, wodurch Methanotrophe aktiviert werden könnten (Zheng *et al.*, 2012). Andererseits führt eine Erhöhung des Wassergehalts des Bodens zu einer verstärkten Methanoldeposition und gleichzeitig zu einer höheren CO<sub>2</sub>-Emission. Diese Beobachtung basiert vermutlich darauf, dass mehr Methanol in Wasser gelöst und von Methylo trophen abgebaut werden kann (Asensio *et al.*, 2007). Die Bodentemperatur könnte folglich die Methylo trophen-Diversität indirekt beeinflussen, da sie über den Faktor Bodenfeuchte mit der Substrat- und Sauerstoffkonzentration des Bodens in Beziehung steht.

### 1.8.6 Salzkonzentration

Eine wichtige Rolle bei der Einnischung von Methylo trophen könnte die Salzkonzentration in der Umgebung spielen. Die Homöostase des Wassergehalts ist durch die Osmoregulation gewährleistet und für Mikroorganismen überlebenswichtig (Csonka, 1989). Extrem halophile *Bacteria* können z.B. intrazellulär anorganische Ionen wie Kalium akkumulieren, um bei hohen extrazellulären Salzkonzentrationen einem Wasserverlust der Zelle entgegenzuwirken. Mikroorganismen müssen an diese erhöhte intrazelluläre Ionenkonzentration angepasst sein. So ist z.B. die Malatdehydrogenase von

*Haloarcula marismortui* vor allem aus sauren und nicht aus basischen Aminosäuren aufgebaut, wodurch die Proteine löslich bleiben (Mevarech *et al.*, 2000). Eine weitere osmoregulatorische Strategie ist die Bildung von kompatiblen Soluten, die sich im Gegensatz zu Elektrolyten nicht auf die Funktionalität von Proteinen auswirken. Es gibt halophile Methylophage wie z.B. *Methylophaga alcalica* (Doronina *et al.*, 2003), die auf Methanol wachsen und Ectoin und Glutamat als kompatible Solute gegen osmotischen Stress bilden (Reshetnikov *et al.*, 2011). Andere Methylophage wie z.B. *Methylosoma difficile* sind hingegen empfindlich gegenüber osmotischem Stress (Rahalkar *et al.*, 2007). Solche Mikroorganismen könnten in Böden mit hohen Salzkonzentrationen einen Selektionsnachteil haben. Vor allem in ariden und semiariden Gebieten kann es zur Versalzung und damit zur Bodendegradation kommen. Wenn mehr Bodenwasser verdunstet, als durch Niederschläge in den Boden eingebracht wird, steigt die Konzentration der im Bodenwasser gelösten Salze (Rowell, 1994).

### 1.8.7 Prädatoren

Ein weiterer Nischen-definierender Faktor könnte das Vorhandensein von Prädatoren sein, die selektiv methylophage Spezies phagozytieren (Kolb, 2009 a; Mancinelli, 1995). In Inkubationsversuchen wurde Kohlenstoff von assimiliertem Methan in bakteriovoren Protisten wie z.B. Flagellaten und in nicht-methanotrophen und räuberischen *Bacteria* wie *Myxobacteria* nachgewiesen, was die Vermutung zulässt, dass methanotrophe *Bacteria* den Protisten und *Myxobacteria* als Nahrung dienen können (Murase und Frenzel; 2007). Die Räuber-Beute-Beziehung in einem Ökosystem ist in der Regel ausgewogen bis das System z.B. durch einen veränderten Substrateintrag gestört wird (Mancinelli, 1995). Auch hier wird deutlich, dass sich Nischen-definierende Faktoren gegenseitig beeinflussen können. Detaillierte Informationen über die Räuber-Methylophagen-Beziehung und eventuell vorhandene Abwehrmechanismen von Methylophagen existieren derzeit nicht.

### 1.8.8 Vegetationstyp und Landnutzung

Sowohl der Vegetationstyp als auch die Landnutzungsintensität haben einen direkten Einfluss auf die chemischen und physikalischen Eigenschaften eines Bodens und könnten ökologische Nischen von Methylophagen mitgestalten (z.B. Birkhofer *et al.*, 2012; Lauber *et al.* 2008) (1.10). Die Böden von unterschiedlichen Vegetationstypen wie z.B. Wälder oder Grünländer, unterscheiden sich in den Kohlenstofflieferanten wie der Streuschicht oder den Wurzeln (Singh *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2007). Die Kohlenstoffverfügbarkeit ist wiederum ein potenzieller Nischen-definierender Faktor (1.8.1). Einige Mikroorganismen können mutualistische oder pathogene Wechselbeziehungen mit Pflanzen eingehen und die Pflanzengemeinschaft direkt beeinflussen. In mutualistischen Pflanzen-Methylophagen-Beziehungen stellen Pflanzen den Methylophagen Nährstoffe wie z.B. Methanol zu



Verfügung. Methylotrrophe produzieren im Gegenzug Vitamine und Wachstumsfaktoren wie z.B. Auxine und wirken so positiv auf das Pflanzenwachstum (Trotsenko *et al.*, 2001). Des Weiteren können diazotrophe Methylotrrophe den Stickstoffhaushalt von Pflanzen positiv beeinflussen, indem sie molekularen Distickstoff fixieren und Ammoniak verfügbar machen. *Methylobacterium nodulans* ist diazotroph und wurde aus den Wurzelknöllchen einer *Crotalaria* Art isoliert. (Jourand *et al.*, 2004). Die Aktivität von *Methylobacterium nodulans* könnte daher durch die Anwesenheit von *Crotalaria* gefördert werden. Neben diesen direkten Effekten können Mikroorganismen in Böden auch einen indirekten Effekt auf die Pflanzengemeinschaft haben. Freilebende *Bacteria* können molekularen Distickstoff fixieren und so die Stickstoffverfügbarkeit für Pflanzen beeinflussen und mit den Pflanzen um Nährstoffe konkurrieren (van der Heijden *et al.*, 2008).

Die Landnutzungsintensität beschreibt den Grad der Nutzung von Wäldern und Grünländern durch den Menschen. Die Einflüsse der Landnutzung auf die Bodeneigenschaften sind vielfältig. In Wäldern kann es durch den Einsatz von schweren Maschinen im Zuge des Holzeinschlages zur Verdichtung des Bodens kommen (Marshall, 2000). Dadurch können physikalische Eigenschaften wie das Porenvolumen und der Belüftungsgrad des Bodens beeinflusst werden (Grigal, 2000). Bodenproben von Spurrinnen zeigten ein geringeres Methanaufnahmepotenzial als unbeeinflusste Bodenproben. Gleichzeitig ist die Abundanz und Diversität der Methanogenen in Bodenproben mit Spurrinnen erhöht. Oxische Böden können folglich durch Verdichtung zu Methanquellen werden (Frey *et al.*, 2011). In Grünländern hat die Beweidung einen Einfluss auf die Sauerstoffverfügbarkeit im Boden, denn es kommt auch hier zur Verdichtung und damit zu einer geringeren Belüftung des Bodens (Bannert *et al.*, 2012; Menneer *et al.*, 2005). Des Weiteren steigt der Eintrag an organischem Material durch tierische Exkremente. Die Aktivität von aeroben Mikroorganismen und damit auch der Sauerstoffverbrauch werden dadurch gefördert. Es entstehen anoxische Mikrozonen im Boden (Bannert *et al.*, 2012; Šimek *et al.*, 2006). Sowohl in Wäldern als auch in Grünländern beeinflusst die Landnutzung durch den Menschen damit potenzielle ökologische Nischen von Methylotrphen.

## 1.9 Funktionelle Genmarker der Methylotrphen

Man schätzt, dass etwa 99% der in der Umwelt vorhandenen Mikroorganismen unter Laborbedingungen nicht kultivierbar sind. Dieses Phänomen wird auch als „great plate count anomaly“ bezeichnet, denn mikroskopisch bestimmte Zellzahlen sind viel größer als die entsprechenden Lebendkeimzahlen (Amann *et al.*, 1995; Hugenholtz *et al.*, 1998; Staley und Konopka, 1985; Vartoukian *et al.*, 2010). Ein möglicher Grund für die „great plate count anomaly“ ist, dass langsam wachsende Mikroorganismen wegen der relativ kurzen Inkubationszeiten in vielen Isolierungsexperimenten übersehen werden. Des Weiteren sind viele Mikroorganismen möglicherweise bis heute nicht kultivierbar, da sie bezüglich der Wachstumsbedingungen unbekannte Ansprüche stellen. Es ist vorstellbar, dass einige

Mikroorganismen nur innerhalb eines Biofilms wachsen können, da sie auf bestimmte Stoffe wie z.B. Wachstumsfaktoren angewiesen sind, die von den anderen Organismen im Biofilm produziert werden (Vartoukian *et al.*, 2010).

Durch den Einsatz von molekularen Techniken, die Primer für Markergene nutzen, können die genannten Einschränkungen der kultivierungsabhängigen Diversitätsanalyse umgangen werden. Solche Markergene können 16S rRNA Gene oder funktionelle Gene sein. Funktionelle Gene sind in der Regel Strukturgene von Schlüsselenzymen in Stoffwechselwegen, die für einen Phänotyp wie z.B. Methanbildung indikativ sind. Die Information über die Diversität von 16S rRNA Genen in den Datenbanken ist umfangreich - derzeit schon über 3,1 Millionen unterschiedliche Genotypen (Quast *et al.*, 2013). Dadurch ist es relativ einfach, neue Sequenzen einem bekannten Phylotyp zuzuordnen. Die Analyse von 16S rRNA Genen erlaubt jedoch keine Rückschlüsse auf die physiologischen Eigenschaften des Organismus, von dem die Sequenz stammt (McDonald *et al.*, 2008).

Funktionelle Gene sind einzigartig für die Physiologie und den Metabolismus einer Gruppe von Mikroorganismen. Die Analyse funktioneller Gene gilt als sensitive und zielgerichtete Methode, um die Diversität einer funktionellen Gruppe von Mikroorganismen in der Umwelt zu detektieren (McDonald *et al.*, 2008). Entsprechende Genmarker wurden für die Methanotrophen entwickelt und eingesetzt. In zahlreichen Diversitätsstudien wurden Gene der Methanmonooxygenase (MMO) amplifiziert (z.B. Barbier *et al.*, 2012; Degelmann *et al.*, 2010; Lüke und Frenzel, 2011; Siljanen *et al.*, 2012). Die MMO katalysiert die Oxidation von Methan zu Methanol. Sie kommt in zwei verschiedenen Formen vor. Es gibt die Membran-gebundene MMO (pMMO) und die lösliche MMO (sMMO). Während die pMMO in fast allen Methanotrophen nachgewiesen werden konnte, ist die sMMO weniger weit verbreitet. Wenige Methanotrophe besitzen beide Formen der MMO. Die drei integralen Membranpolypeptide der pMMO werden durch die Gene *pmoCAB* innerhalb eines Operons kodiert. Die sMMO besteht aus drei verschiedenen Komponenten, einer Hydroxylase, kodiert durch *mmoXYZ*, einer Reduktase, kodiert durch *mmoC*, und einem regulatorischen Protein, kodiert durch *mmoB* (McDonald *et al.*, 2008). Als Markergene für Methanotrophe fungieren vor allem *pmoA* und *mmoX*. Erste *pmoA* und *mmoX* Primersysteme wurden 1995 und 1990 entwickelt (Holmes *et al.*, 1995; Tsien *et al.*, 1990). Heute sind die *pmoA* Datenbanken sehr umfangreich. Die *mmoX* Diversität in den Datenbanken ist hingegen gering. Ein Grund hierfür könnte die starke Konservierung von *mmoX* sein. Des Weiteren ist es möglich, dass die verwendeten Primersysteme zur Amplifikation von *mmoX* zu wenig degeneriert sind (McDonald *et al.*, 2008).

Darüber hinaus gibt es allerdings nur wenige Studien, die Methylothrophe in der Umwelt anhand von Genmarkern analysieren, die nicht für die MMO kodieren. Ein wichtiger Genmarker ist das *mxoF*-Gen, das für die große Untereinheit der PQQ-abhängigen MDH kodiert (1.7.1). Mit Hilfe dieses Genmarkers können nicht nur Methanotrophe detektiert werden, sondern auch solche Methylotrophen, die zwar Methanol aber nicht Methan nutzen

können, was letztlich auf die meisten bislang isolierten Methyлотроphen zutrifft (Kolb, 2009 a). Erste *mxoF*-spezifische Primer wurde 1997 anhand der Sequenzinformation von drei methyлотроphen *Bacteria* (*Methylobacterium extorquens*, *Methylobacterium organophilum* und *Paracoccus denitrificans*) entwickelt (McDonald und Murrell, 1997). Diese Primer wurde eingesetzt, um die Diversität von Methyлотроphen in verschiedenen Umgebungen wie z.B. an den Wurzeln von Reispflanzen (Horz *et al.*, 2001), in Tiefseesedimenten (Wang *et al.*, 2004) und im Boden von Reisfeldern (Henckel *et al.*, 1999) zu analysieren. Im Jahr 2007 wurde einer der beiden Primer modifiziert, um eine breitere Diversität von *mxoF*-Sequenzen detektieren zu können. Basis für das neue Primersystem waren 14 verschiedene *mxoF*-Sequenzen (Neufeld *et al.*, 2007). Andere Diversitätsstudien an methyлотроphen Gemeinschaften nutzen Markergene des H<sub>4</sub>MPT-abhängigen Formaldehydoxidationsweges (1.7.2). Der H<sub>4</sub>MPT-abhängige Formaldehydoxidationsweg ist vermutlich früh in der Evolution der Methyлотроphen entstanden. Er gilt als das am weitesten verbreitete Modul der methyлотроphen Physiologie. Primer für *fae* und *mtdB* wurden erstmals 2004 publiziert (Kayuzhnaya *et al.* 2004). *mch* (kodiert Mch)- und *fhcD* (kodiert FhcD)-Primersysteme wurden 1999 und 2005 entwickelt (Kalyuzhnaya *et al.*, 2005 b; Vorholt *et al.*, 1999;). Molekulare Analysen mit Hilfe von Genmarkern des H<sub>4</sub>MPT-abhängigen Formaldehydoxidationsweges wurden bisher lediglich für zwei Süßwasserseen durchgeführt (Kalyuzhnaya *et al.*, 2004; Nercissian *et al.*, 2005). Diversitätsstudien mit Hilfe dieser Genmarker in anderen Umwelten fehlen bis heute.

Primersysteme werden anhand einer begrenzten Anzahl von Sequenzen entworfen, was die potenziell identifizierbare phylogenetische Diversität limitiert. So können z.B. durch *mxoF*-basierte Primer gramnegative aber keine grampositive *Bacteria* nachgewiesen werden (Chistoserdova *et al.*, 2009). Daher wurden zur Analyse der Diversität in dieser Doktorarbeit verschiedene Primersysteme eingesetzt und sowohl die *mxoF*-Diversität als auch die Diversität von *fae* und *mch* bestimmt. Durch die Wahl des Genmarkers *mxoF* wurde ein Fokus auf die Methanol-oxidierenden Methyлотроphen gelegt und durch die Anwendung von Primersystemen zur Amplifikation von Genen des H<sub>4</sub>MPT-abhängigen Formaldehydoxidationsweges eine möglichst breite Methyлотроphen-Diversität detektiert.

## 1.10 Ziele und Hypothesen

Oxische Böden können atmosphärisches Methanol aufnehmen. Eine weitere Methanolquelle in oxischen Böden sind unterirdische Pflanzenteile (1.5). Die Methanolkonzentration in oxischen Böden liegt wahrscheinlich unter ein Mikromol pro Kilogramm Boden (Conrad und Claus, 2005; Kolb, 2009 a). Methylo-trophe Mikroorganismen können C1-Verbindungen wie Methanol als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen (Anthony, 1982; Chistoserdova *et al.*, 2009; Lidstrom, 2006). Es liegt nahe, dass Methylo-trophe in Böden *in situ* relevante Methanolkonzentrationen oxidieren und oxische Böden damit eine wichtige Methanolsenke im globalen Methanolkreislauf sind (Hypothese 1).

Über die Diversität der aeroben methylo-trophen *Bacteria* ist wenig bekannt. Die meisten bekannten methylo-trophen Arten gehören zu den *Alphaproteobacteria* (Kolb, 2009 a; Tab. 2) und *Alphaproteobacteria* sind in Böden eine häufig detektierte Gruppe (z.B. Liu *et al.*, 2011). Es ist daher wahrscheinlich, dass *Alphaproteobacteria* innerhalb der Methylo-trophen-Gemeinschaften in Böden am häufigsten vertreten sind (Hypothese 2).

Zahlreiche Faktoren könnten die Gemeinschaft der Methylo-trophen in Böden beeinflussen (1.8). Die Faktoren Vegetationstyp und die Landnutzungsintensität integrieren verschiedene chemische und physikalische Eigenschaften von Böden (1.8.8). Der Vegetationstyp und die Landnutzungsintensität haben daher möglicherweise einen Einfluss auf die Gemeinschaft der Methylo-trophen in Böden (Hypothese 3).

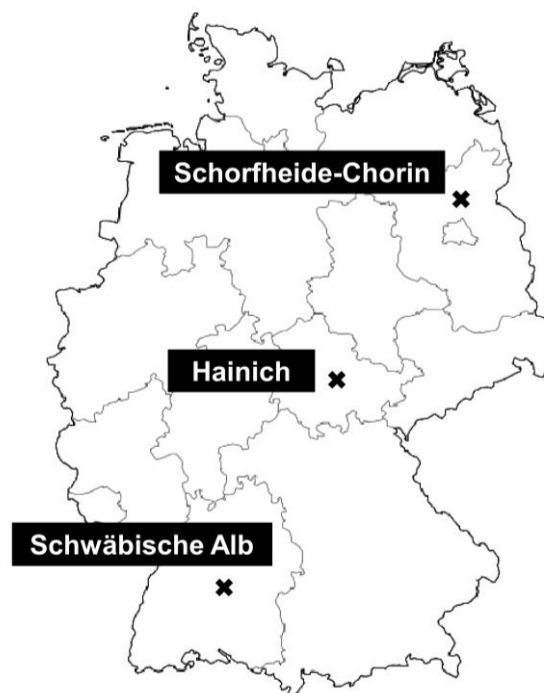
### **Für diese Arbeit können daher folgende Ziele definiert werden:**

1. Bestimmung von apparenten kinetischen Parametern der Methanoloxidation bei *in situ* relevanten Methanolkonzentrationen in oxischen Böden durch radiochemische Methoden.
2. Identifizierung von Genotypen in Bodenaufschlämmungen, die durch *in situ* relevante Methanolkonzentrationen angeregt werden mittels molekularer Fingerabdruck-Methode.
3. Analyse der Gemeinschaft der Methylo-trophen in Grünland- und Waldböden mittels Amplikon-Pyrosequenzierung und Kultivierung.
4. Identifizierung von Umweltparametern, die mit der Gemeinschaftsstruktur der Methylo-trophen korrelieren mit Hilfe von statistischen Methoden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Standortbeschreibung

Es wurden Bodenproben von insgesamt 14 verschiedenen Standorten (Tab. 3) genommen. Die Bodenproben FG, OG und HEG 6 wurden hinsichtlich ihres Methanoxidationspotenzials untersucht (Tab. 3). Die Bodenprobe FG stammte aus dem Fichtelgebirge. Sie wurde an einer Waldlichtung entnommen, die während des Wintersturms Kyrill im Jahr 2007 entstand. Die Bodenprobe OG stammte vom Garten des Instituts für Ökologische Mikrobiologie der Universität Bayreuth. Die Bodenprobe HEG 6 stammte vom Nationalpark Hainich (Abb. 3), einem Standort, der im Rahmen einer Initiative zur Förderung der Biodiversitäts- und Ökosystemforschung in Deutschland (DFG SPP 1374) eingerichtet wurde (Fischer *et al.*, 2010).



**Abb. 3:** Geographische Lage der drei Exploratorien in Deutschland. Das Exploratorium Schwäbische Alb befindet sich in Baden-Württemberg, das Exploratorium Hainich befindet sich in Thüringen und das Exploratorium Schorfheide-Chorin befindet sich in Brandenburg.

Die Untersuchungsstandorte zur Studie der Diversität von Methyloprophen (Tab. 3) befanden sich innerhalb des Biosphärengebiets Schwäbische Alb (AEG 2, AEG 7, AEW 5, AEW 8), des Nationalparks Hainich und seiner Umgebung (HEG 6, HEG 9, HEW 5, HEW 12) und des Biosphärenreservats Schorfheide-Chorin (SEG 2, SEG 6, SEW 5, SEW 9) (Abb. 3). Diese drei Gebiete werden als Exploratorien bezeichnet (Fischer *et al.*, 2010).

**Tab. 3:** Beschreibung der Standorte und durchgeführte Analysen.

Standort	Geographische Lage	Vegetationstyp	Landnutzungsintensität	Analyse
FG	N50°08', E11°52'	Grünland	-	MeOH ox
OG	N49°57'37'', E11°35'42''	Grünland	-	MeOH ox
AEG 2	N48° 22' 36.686", E9° 28' 22.023"	Grünland	Intensiv	Pyro, Isol, MPN
AEG 7	N48° 23' 29.116", E9° 22' 36.65"	Grünland	Nicht intensiv	Pyro, MPN
AEW 5	N48° 25' 10.626", E9° 24' 52.854"	Wald	Intensiv	Pyro, MPN
AEW 8	N48° 22' 57.322", E9° 22' 56.584"	Wald	Nicht intensiv	Pyro, Isol, MPN
HEG 6	N51° 12' 53.766", E10° 23' 28.395"	Grünland	Intensiv	MeOH ox, Pyro, TRFLP, Isol, MPN
HEG 9	N51° 13' 26.031", E10° 22' 50.834"	Grünland	Nicht intensiv	Pyro, Isol, MPN
HEW 5	N51° 15' 49.961", E10° 14' 27.448"	Wald	Intensiv	Pyro, Isol, MPN
HEW 12	N51° 6' 2.477", E10° 27' 18.659"	Wald	Nicht intensiv	Pyro, Isol, MPN
SEG 2	N53° 5' 21.505", E13° 58' 48.169"	Grünland	Intensiv	Pyro
SEG 6	N53° 6' 12.583", E13° 37' 22.2"	Grünland	Nicht intensiv	Pyro, MPN
SEW 5	N53° 3' 25.321", E13° 53' 7.318"	Wald	Intensiv	Pyro <sup>a</sup> , b, Isol, MPN
SEW 9	N53° 2' 40.513", E13° 48' 36.371"	Wald	Nicht intensiv	Pyro <sup>a</sup> , Isol, MPN

Abkürzungen: MeOH ox, Bestimmung der Oxidationsraten von Methanol im Boden basierend auf der Menge an gebildetem <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> aus <sup>14</sup>C-Methanol; Pyro, Amplikon-Pyrosequenzierung der Gene *mxoF*, *fae* und *mch*; TRFLP, Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analysen von *mch*; Isol, Isolierung von Reinkulturen; MPN, Bestimmung der Zellzahlen mittels „Most Probable Number“ (MPN)-Methode; -, keine Angabe.

<sup>a</sup>Keine Amplifikation von *mxoF*.

<sup>b</sup>Keine Amplifikation von *mch* und *fae*.

Das Biosphärengebiet Schwäbische Alb wurde 2008 eingerichtet und umfasst mehr als 85.000 ha. Es befindet sich in Baden-Württemberg im Südosten von Stuttgart (Abb. 3). Hang- und Schluchtenwälder am Albtrauf, einem Stufenhang des südwestdeutschen

Schichtstufenlandes, sind charakteristisch für dieses Biosphärengebiet. Das Ausgangsgestein der Bodenbildung ist Kalkgestein. Das Solum, also der Bodenkörper ohne Streuauflage und Ausgangsgestein, ist schwächer, der Grobboden stärker ausgeprägt als in den beiden anderen Exploratorien. Schluffige, lehmige und tonige Bodenarten dominieren in der Schwäbischen Alb (Exploratorien zur funktionellen Biodiversitätsforschung, 2011 a). Die Waldvegetation der Schwäbischen Alb ist vielseitig. Es gibt sowohl natürliche Buchenwälder als auch gemischten und intensiv bewirtschafteten Buchen- bzw. Fichtenmonokulturen. Die Grünlandvegetation umfasst extensiv genutzte Schafweiden, Halbtrockenrasen, unbewirtschaftetes und intensiv genutztes Grünland (Exploratorien zur funktionellen Biodiversitätsforschung, 2011 b; Fischer *et al.*, 2010)

Der Nationalpark Hainich wurde 1997 gegründet und ist 7.600 ha groß. Er gehört zum Gebiet Hainich-Dün in Thüringen (Abb. 3) und schützt einen Teil des größten zusammenhängenden Laubwaldgebietes Deutschlands. Der Hainich ist ein Muschelkalk-Höhenzug. Böden haben sich aus Kalkstein und Löss entwickelt. Die Bodentypen Parabraunerde und Pseudogley dominieren. Die Waldvegetation besteht hauptsächlich aus reinen und gemischten Buchenwäldern. Man findet die typischen Buchenwaldbetriebsformen wie den Plenterwald, den Altersklassenwald, den Naturwald und Reste einer Mittelwaldbewirtschaftung. Grünländer bestehen aus Gras- und Agrarflächen unterschiedlicher Bewirtschaftungsintensität. Vor allem die Beweidung durch Schafe spielt bei der Offenhaltung der Grasflächen eine große Rolle (Exploratorien zur funktionellen Biodiversitätsforschung, 2011 c; Fischer *et al.*, 2010).

Das Biosphärenreservat Schorfheide-Chorin wurde 1990 eingerichtet und umfasst 130.000 ha. Es befindet sich in Brandenburg (Abb. 3), also in einem Gebiet Deutschlands, das im Gegensatz zu den anderen beiden Exploratorien in der letzten Eiszeit durch Gletscherbewegungen geformt wurde. Während der Wechselvereisung, die vor 15000 Jahren endete, entstand durch Vorschieben und Zurückweichen des Eises eine typische Moränenlandschaft aus Grund- und Endmoränen und Sanderebenen vor den Endmoränen. Zahlreiche Seen, ein weiteres Relikt aus der Eiszeit, sind typisch für die Schorfheide. Das durch die Eiszeit geschaffene Relief war die Basis für die Entwicklung unterschiedlicher Bodentypen, darunter Braunerden, Parabraunerden, Pararendzinen und Moorböden. Im Gegensatz zum Nationalpark Hainich und zum Biosphärenreservat Schwäbische Alb sind in der Schorfheide auch sandige Bodentypen wie Podsole zu finden. Die Waldvegetation besteht hauptsächlich aus Kiefern-Buchen-Halbforsten und Buchenwäldern. Der Altersklassenwald ist die vorwiegende Betriebsform. Offenlandschaften bestehen neben den Wirtschaftsgrasländern aus Großseggengesellschaften und mit Nitrophyten bewachsene Wegrändern (Exploratorien zur funktionellen Biodiversitätsforschung, 2011 d; Fischer *et al.*, 2010). An nährstoffarmen Standorten mit guten Drainagebedingungen kann man Magerrasen finden. Wiesen im Bereich von Niederungen sind oft vom Grundwasser beeinflusst und bilden ausgedehnte Niedermoorflächen (Exploratorien zur funktionellen Biodiversitätsforschung, 2011 e; Fischer *et al.*, 2010).

In einem Exploratorium gibt es insgesamt 1000 Untersuchungsflächen (Fischer *et al.*, 2010). Diese werden im Folgenden auch als Plots bezeichnet. In dieser Doktorarbeit wurden je Exploratorium zwei Wald- und zwei Grünlandplots beprobt, die sich in der Landnutzungsintensität unterschieden (Tab. 3). Die Grünlandplots AEG 2, HEG 6 und SEG 2 und waren gedüngt und unterlagen damit einer intensiveren Landnutzung als die ungedüngten Wiesen AEG 7, HEG 9 und SEG 6. Bei den Waldplots handelte es sich um bewirtschaftete Altersklassenwälder (AEW 5, HEW 5, SEW 5) und unbewirtschaftete Buchenwälder (AEW 8, HEW 12, SEW 9).

## 2.2 Probenahme

Die Standorte FG und OG, die nicht innerhalb der Exploratorien lagen (2.1), wurden im Jahr 2010 beprobt (Tab. 4). Dazu wurden an drei Stellen pro Untersuchungsfläche Bohrkern genommen und die A-Horizonte zu einer Mischprobe vereinigt. Anschließend wurden Wurzeln und Steine manuell aus den Proben entfernt.

**Tab. 4:** Zeitpunkte der Probenahme.

Standort	April 2008	Dezember 2008	April 2009	Mai 2009	Juni 2009	August 2009	Oktober 2009	Oktober 2010
FG	-	-	-	-	-	-	-	+
OG	-	-	-	-	-	-	-	+
AEG 2	+	-	+	-	+	+	+	-
AEG 7	+	-	+	-	+	+	+	-
AEW 5	+	-	+	-	+	+	+	-
AEW 8	+	-	+	-	+	+	+	-
HEG 6	+	+	+	+	+	- <sup>a</sup>	+	-
HEG 9	+	+	+	+	- <sup>a</sup>	+	+	-
HEW 5	+	+	+	+	+	+	+	-
HEW 12	+	+	+	+	+	+	+	-
SEG 2	+	-	+	-	+	- <sup>a</sup>	+	-
SEG 6	+	-	+	-	- <sup>a</sup>	+	+	-
SEW 5	+	-	+	-	+	+	+	-
SEW 9	+	-	+	-	+	+	+	-

Abkürzungen: +, Beprobung; -, keine Beprobung.

<sup>a</sup>Bodenprobe konnte wegen Beweidung nicht genommen werden.

Die Beprobung Flächen innerhalb der Exploratorien fand gemeinsam mit weiteren Mitgliedern des DFG-Projektes (SPP 1374) zur funktionellen Biodiversitätsforschung statt. Die Untersuchungsflächen waren 20 m lang und 20 m breit. Pro Untersuchungsfläche wurden fünf Bohrkern genommen. Die A-Horizonte der Bodenproben wurden von Wurzeln und Steinen befreit und zu einer Mischprobe vereinigt. Bodenproben für molekulare Analysen wurden während des Transportes auf Trockeneis, Bodenproben für kultivierungsabhängige Analysen auf Eis gelagert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Bodenproben für molekulare Analysen im Institut für Ökologische Mikrobiologie bei -80°C



bzw. für kultivierungsabhängige Analysen bei 2°C im Dunkeln aufbewahrt. Bodenproben der Exploratorien wurden zu verschiedenen Zeitpunkten in den Jahren 2008 und 2009 genommen (Tab. 4). Durch Vereinigen der PCR-Produkte der Bodenproben vom April, Juni, August und Oktober 2009 konnte mit Hilfe der Amplikon-Pyrosequenzierung (2.8.9) eine übers Jahr gemittelte Diversität dargestellt werden. Bodenproben, die 2008 und 2009 genommen wurden, wurden zur Bestimmung der Lebendzellzahlen (2.7.3) und zur Isolierung von Reinkulturen (2.7.2) verwendet.

## 2.3 Bestimmen von Bodenparametern

Wichtige Bodenparameter wurden in dieser Arbeit oder im Rahmen anderer Projekte des Verbundprojektes Exploratorien zur funktionellen Biodiversitätsforschung ermittelt. Das Trockengewicht und der gravimetrische Wassergehalt wurden in dieser Arbeit und im Rahmen zweier Bachelorarbeiten (Glowik, 2008; Zaatreh, 2008) in Form von Triplikaten bestimmt. Dazu wurden 3 g des Bodens eingewogen und bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Anschließend wurde das Gewicht des Bodens gemessen. Der Quotient aus Wassermasse und Trockenmasse ergab den gravimetrischen Wassergehalt (Blume *et al.*, 2010).

Böden können auf Grund ihrer Gliederung in Bodenhorizonte bestimmten Entwicklungszuständen oder Bodentypen zugeordnet werden. Informationen über den Bodentyp wurden nach dem Schema der „World Reference Base for Soil Resources“ (WRB) bestimmt (Fischer *et al.*, 2010).

Die Ammoniumkonzentration, der Gesamtstickstoff- und der Gesamtkohlenstoffgehalt wurden der zentralen Datenbank des Forschungsprojektes Biodiversitätsexploratorien entnommen. Die Daten wurden von Dr. Schöning (Max-Planck-Institut für Biochemie, Jena) zur Verfügung gestellt.

Der pH-Wert und die Nitratkonzentration der Böden wurden von einem weiteren Projektpartner (Mirjam Selzer, Lehrstuhl für Ökologische Mikrobiologie, Universität Bayreuth) bestimmt. Der Boden-pH-Wert wurde in wässrigen Aufschlämmungen gemessen (Schachtschabel *et al.*, 2002). Die Nitratkonzentration wurde spektrophotometrisch bestimmt (Velghe und Claeys, 1985).

## 2.4 Verwendete Chemikalien und Gase

Die Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt, DE), Bio-Rad (Richmond, US), Boehringer (Mannheim, DE), Eppendorf (Hamburg, DE), Fluka (Neu-Ulm, DE), Merck (Darmstadt, DE) oder Sigma (Diesenhofen, DE) bezogen. Lösungen, Medien und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O; Seralpur Pro 90 CN, Seral Erich Alhäuser, Ransbach-Baumbach, DE) angesetzt. Für Arbeiten mit DNA wurde sterilfiltriertes und autoklaviertes Wasser (PCR-ddH<sub>2</sub>O) verwendet. Oligonukleotide wurden von den Firmen Biomers.net (Ulm, DE) und Microsynth AG (Balgach, CH) hergestellt. Gase stammen von der Firma Rießner (Lichtenfels, DE).

## 2.5 Sterilisation

Die Sterilisation von Kultivierungsmedien und Lösungen erfolgte, sofern nicht anders angegeben, durch Dampfsterilisation (Sanoclav, Wolf, Geislingen, DE) bei 120°C und 1 bar Überdruck für 25 min. Serumflaschen wurden mittels Heißluft (180°C, mind. 5 h) sterilisiert.

## 2.6 Methanoxidation

Ein zentrales Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung von apparenten Michaelis-Menten-Parametern der Methanoxidation in oxischen Böden. Erste Versuche, den Verbrauch von zugesetztem Methanol in Bodenaufschlämmungen mit Hilfe der GC-FID-Methode (1.5) nachzuweisen, blieben ohne Erfolg. Die methanolhaltigen Proben wurden in flüssiger Form in den Einspritzblock des GC-Apparates gespritzt. Dabei kam es zu Ablagerungen im Liner, was die Reproduzierbarkeit der Versuche negativ beeinflusste. Radiochemische Methoden zur Stoffflussanalyse von Methanol wurden bereits für Meerwasserproben (Dixon *et al.*, 2011) und Pflanzengewebe (Cossins, 1964) erfolgreich angewandt und wurden daher in dieser Doktorarbeit zum Nachweis der Methanoxidation in Bodenaufschlämmungen genutzt.

### 2.6.1 Messung der Oxidation von Methanol zu CO<sub>2</sub>

Mit Hilfe der radioaktiv markierten Verbindung <sup>14</sup>C-Methanol wurde die Umsetzung von Methanol zu CO<sub>2</sub> zu verfolgt. Dazu wurde 1 g Frischgewicht (g<sub>FG</sub>) Boden (entspricht 0,4 g bzw. 0,8 g Trockengewicht für FG bzw. HEG 6) bzw. 1 g<sub>FG</sub> Pflanzenmaterial in ein steriles Hungate-Röhrchen (Bellco Glass Inc., Vineland, US) überführt und mit <sup>12</sup>C-Methanol und PCR-ddH<sub>2</sub>O oder Saline (Tab. 5) auf 5 ml aufgefüllt.

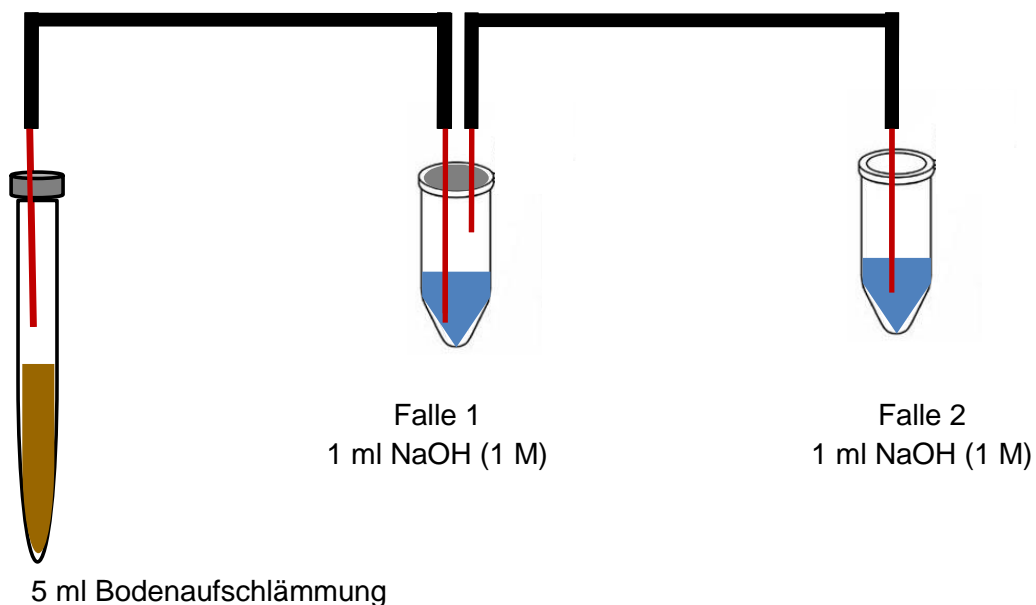
Anschließend wurden 10 µl einer <sup>14</sup>C-Methanolarbeitslösung (entspricht 1,57 x 10<sup>5</sup> dpm bzw. 1,2 nmol; Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, DE) zu den Ansätzen pipettiert und die

Hungate-Röhrchen luftdicht verschlossen. Die Menge an radioaktivem Material war damit in allen Ansätzen gleich, während sich das Mengenverhältnis von  $^{14}\text{C}$ -Methanol und  $^{12}\text{C}$ -Methanol in den Ansätzen unterschied. Die Versuche wurden in Form von Duplikaten angesetzt. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei Raumtemperatur.

**Tab. 5:** Zusammensetzung der Salinelösung. Der pH-Wert war 7,4.

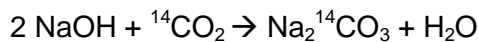
Substanz	Massenkonzentration (g l <sup>-1</sup> )
NaCl	8,0
KCl	0,2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1,78
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,27

Die Menge an gebildetem  $^{14}\text{CO}_2$  wurde mit Hilfe einer zweistufigen  $\text{CO}_2$ -Falle (Abb. 4) (Jones, 1999; Kemmitt *et al.*, 2008) und einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Beckman LS 6500, Fullerton, US) bestimmt. Durch die zweistufige  $\text{CO}_2$ -Falle (Abb. 4) wurde das  $\text{CO}_2$  in der Gasphase der Ansätze zweimal hintereinander in Natronlauge als Carbonat gefällt (Reaktionsgleichung 9).



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der zweistufigen  $\text{CO}_2$ -Falle. Das Hungate-Röhrchen enthält 5 ml Bodenaufschlammung (braun). Über Schläuche (schwarz) und Nadeln (rot) war die Gasphase im Hungate-Röhrchen mit zwei Reaktionsgefäßen verbunden, die NaOH (blau) enthielten. Die Falle 1 war gasdicht mit einem Gummistopfen (grau) verschlossen.

Reaktionsgleichung 9:



Das Hungate-Röhrchen wurde über Schläuche an die CO<sub>2</sub>-Fallen angeschlossen und zweimal mit 20 ml steriler Luft gespült. Von Falle 1 und Falle 2 wurden je 100 µl NaOH entnommen und in je 10 ml des bereitgestellten Szintillationscocktails (Ecolume™ Liquid Scintillation Cocktail, MP Biomedicals, Irvine, California, US) gegeben. Alle Arbeiten erfolgten unter dem Abzug. Der Szintillationscocktail wurde geschüttelt und über Nacht stehen gelassen, bevor die Radioaktivität gemessen wurde. Es wurde die Summe der cpm-Werte der Fallen 1 und 2 gebildet und mit Hilfe der spezifischen Radioaktivität des <sup>14</sup>C-Methanols die Gesamtmenge an gebildetem CO<sub>2</sub> berechnet (Beispielrechnung 1).

**Beispielrechnung 1:** Bestimmung der CO<sub>2</sub>-Menge, die durch Methanoloxidation gebildet wurde.

$$\text{CO}_2 = \frac{(A_{F1} + A_{F2})}{A_{\text{spez}}} \times \text{MV}$$

$$\text{CO}_2 = \frac{(2078 \text{ dpm} + 2162 \text{ dpm})}{1,22 \times 10^{11} \text{ dpm mmol}^{-1}} \times 1,21 = 3,78 \times 10^{-8} \text{ mmol}$$

CO<sub>2</sub>, Menge an CO<sub>2</sub> (mmol g<sub>FG</sub><sup>-1</sup>)

A<sub>F1</sub>, Aktivität in Falle 1

A<sub>F2</sub>, Aktivität in Falle 2

A<sub>spez</sub>, Spezifische Radioaktivität der <sup>14</sup>C-Methanol Stammlösung

MV, Mengenverhältnis von <sup>12</sup>C- und <sup>14</sup>C-Methanol zu <sup>14</sup>C-Methanol

Als Kontrolle für abiotische Methanoloxidation diente durch Autoklavieren sterilisiertes ddH<sub>2</sub>O, das mit <sup>12</sup>C-Methanol und <sup>14</sup>C-Methanol versetzt wurde. Die hieraus ermittelten Werte für <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Konzentrationen wurden von den entsprechenden Werten für inokulierte Ansätze abgezogen.

## 2.6.2 Methanoxidation in Bodenaufschlammungen und durch Pflanzenmaterial

Pflanzen enthalten Alkoholdehydrogenasen, die Methanol zu  $\text{CO}_2$  oxidieren können (Cossins, 1964). Um herauszufinden, ob Alkoholdehydrogenasen in verbliebenem Pflanzenmaterial der Bodenaufschlammungen oder in Mikroorganismen im Bodenkörper für die Methanoxidation verantwortlich sind, wurden Ansätze mit 1 g<sub>FG</sub> Boden OG, gewaschene Wurzeln des Bodens OG und unter sterilen Bedingungen gezüchtete *Arabidopsis thaliana* (2.6.3, Abb. 5) durchgeführt (Tab. 6).

**Tab. 6:** Ansätze zur Bestimmung der Methanoxidation durch Boden und Pflanzenmaterial. Jeder Ansatz enthielt 1 g<sub>FG</sub> Boden bzw. 1 g<sub>FG</sub> Pflanzenmaterial. Die Ansätze wurden auf 5 ml mit Wasser oder Saline aufgefüllt (2.1). Die Konzentration des eingesetzten Methanols (Summe  $^{12}\text{C}$ -/ $^{14}\text{C}$ -Methanol) war 0,05  $\mu\text{mol g}_{\text{FG}}^{-1}$  bzw. 10  $\mu\text{M}$ . Die Konzentration des  $^{14}\text{C}$ -Methanols war 1,2 nmol g<sub>FG</sub><sup>-1</sup> (2.1). Die Radioaktivität pro Ansatz war  $1,57 \times 10^5$  dpm.

Ansatz	Medium	Methanolkonzentration (Summe $^{12}\text{C}$ -/ $^{14}\text{C}$ -Methanol; $\mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$ )
Sterilisiertes Wasser	H <sub>2</sub> O	-
Boden HEG 6	H <sub>2</sub> O	0,07
Boden OG	H <sub>2</sub> O	0,07
Boden FG	H <sub>2</sub> O	0,14
Wurzel (OG)	H <sub>2</sub> O	0,23
<i>A. thaliana</i>	Saline	6,97
Pilz	Saline	0,23

Abkürzungen: g<sub>FG</sub><sup>-1</sup>, pro g Frischgewicht; g<sub>TG</sub><sup>-1</sup>, pro g Trockengewicht; -, keine Angabe pro g Trockengewicht möglich d.h. Methanolkonzentration lag bei 10  $\mu\text{M}$ .

In den Ansätzen mit *A. thaliana* kam es zum Wachstum eines Pilzmyzels. Um den Einfluss des Pilzes auf die Methanoxidation zu überprüfen, wurden 100  $\mu\text{l}$  des bewachsenen Überstandes in 5 ml Saline (Tab. 5) mit  $^{12}\text{C}$ - und  $^{14}\text{C}$ -Methanol überführt. Als Kontrolle für abiotische Aktivität wurden Ansätze mit 10 mM Kaliumcyanid hergestellt, das die Cytochrom-c-Oxidase der Atmungskette hemmt (Watanabe *et al.*, 1996). Von allen Ansätzen wurde direkt nach der Inokulation zum Zeitpunkt  $t_0$  und nach 13 Tagen zum Zeitpunkt  $t_{\text{End}}$  bestimmt, wie viel Prozent der eingesetzten Radioaktivität als  $^{14}\text{CO}_2$  aufgefangen werden konnten.

## 2.6.3 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Die Herstellung einer sterilen („keimfreien“) *Arabidopsis thaliana* (Abb. 5) erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Mustroph (Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Universität Bayreuth). Alle hierzu nötigen Arbeitsschritte wurden an der Sterilbank durchgeführt.

Pflanzensamen wurden 10 min lang in 10 ml Ethanol (100%) geschwenkt. Der Überstand wurde abgegossen und 10 ml Hypochloridlösung (Tab. 7) zugegeben.

**Tab. 7:** Zusammensetzung der Hypochloridlösung.

Substanz	Volumen
Natriumhypochlorid (2%)	400 µl
Triton X-100 (0,04%)	8 µl
H <sub>2</sub> O	20 ml

Das Gemisch wurde für 10 min geschwenkt und der Überstand abgegossen. Die Samen wurden viermal mit je 10 ml sterilem ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurden die Samen in 4 ml sterilem ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und für drei Tage im Kühlschrank gelagert. Hier erfolgte die Quellung der Samen. Dann wurden die Samen auf festes Murashige-Skoog Nährmedium (MS Medium; Murashige und Skoog, 1962) (Tab. 8) mit einem pH-Wert von 5,7 aufgebracht und die Pflanzen im Licht zur Keimung gebracht.



**Abb. 5:** *Arabidopsis thaliana*, angezogen unter sterilen Bedingungen.

**Tab. 8:** Zusammensetzung des MS Mediums (Murashige und Skoog, 1962). Der pH-Wert wurde mit KOH (1 M) auf 5,7 eingestellt.

Substanz	Massenkonzentration (g l <sup>-1</sup> )
MS-Salze	4,4
Saccharose	10
Agar	10

Abkürzung: MS-Salze, Murashige und Skoog-Salzmischung.

### 2.6.4 Apparente Michaelis-Menten-Kinetiken

Wenn sich die Reaktionsgeschwindigkeit eines Enzyms mit steigender Substratkonzentration erhöht und schließlich ein Maximum erreicht, dann kann man diesen Zusammenhang mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 1) beschreiben.

**Gleichung 1:** Michaelis-Menten-Kinetik.

$$v_0 = v_{max} \times \frac{[s]}{[s] + K_m}$$

$v_0$ , Reaktionsgeschwindigkeit zu Reaktionsbeginn;  $v_{max}$ , Maximale Reaktionsgeschwindigkeit;  $[s]$  Substratkonzentration;  $K_m$ , Michaelis-Menten-Konstante (Segel, 1993).

Trägt man die Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration auf, ergibt sich eine Hyperbel. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{max}$ ) wird erreicht, wenn alle aktiven Zentren der Enzyme mit Substrat gesättigt sind. Die Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) gibt diejenige Substratkonzentration an, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht ist. Die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit ist erreicht, wenn die Hälfte der aktiven Zentren ein Substrat gebunden hat. Der  $K_m$ -Wert ist ein Maß für die Substrataffinität des Enzyms. Je niedriger der  $K_m$ -Wert ist, desto höher ist die Affinität des Enzyms zum Substrat (Segel, 1993).

In diesem Versuch wurde die Reaktionsgeschwindigkeit von Methanoldehydrogenasen in Bodenaufschlämmungen (Tab. 9) bestimmt. Es handelte sich nicht um aufgereinigte Enzyme definierter Menge, sondern um Mischsysteme. Es wurden also apparente Michaelis-Menten-Parameter bestimmt. Die Diffusionsgeschwindigkeit des Substrates in der Umgebung und die Menge an Transportermolekülen in der Membran beeinflussen den apparenten  $K_m$ -Wert und den apparenten  $v_{max}$ -Wert (Button, 1998). Die spezifische Affinität, der  $a_s^0$ -Wert, wird als Quotient beider Parameter berechnet (Gleichung 2) und ist unabhängig von äußeren Faktoren. Die Bestimmung des  $a_s^0$ -Wertes ist eine geeignete Methode, um mikrobielle Prozesse in verschiedenen Umwelten und unter unterschiedlichen Inkubationsbedingungen zu vergleichen.

**Tab. 9:** Ansätze zur Bestimmung von apparenten Michealis-Menten-Parametern. Jeder Ansatz enthielt 1 g<sub>FG</sub> Boden. Die Ansätze wurden auf 5 ml mit Wasser aufgefüllt (2.1). Die Konzentration des <sup>14</sup>C-Methanols war 1,2 nmol g<sub>FG</sub><sup>-1</sup> (2.1). Die Radioaktivität pro Ansatz war 1,57 x 10<sup>5</sup> dpm. Die Bodenprobe HEG 6 wurde vor dem Ansetzen der Bodenaufschlammungen etwa 1 Jahr lang bei 2°C gelagert. Die Bodenprobe FG wurde unmittelbar nach der Probennahme eingesetzt. Das Medium war sterilisiertes Wasser.

Plot	Methanolkonzentration (Summe <sup>12</sup> C-/ <sup>14</sup> C-Methanol; μmol g <sub>TG</sub> <sup>-1</sup> )	Methanolkonzentration (Summe <sup>12</sup> C-/ <sup>14</sup> C-Methanol; μmol g <sub>FG</sub> <sup>-1</sup> )	Methanolkonzentration (Summe <sup>12</sup> C-/ <sup>14</sup> C-Methanol; mM)
FG	0,004	0,001	0,00005
	0,140	0,050	0,01
	1,369	0,500	0,1
	13,661	5,000	1
	136,612	50,000	10
	683,060	250,000	50
HEG 6	0,002	0,001	0,00005
	0,062	0,050	0,01
	0,606	0,500	0,1
	6,056	5,000	1
	60,435	50,000	10
	302,176	250,000	50

Abkürzungen: g<sub>FG</sub><sup>-1</sup>, pro g Frischgewicht; g<sub>TG</sub><sup>-1</sup>, pro g Trockengewicht.

**Gleichung 2:** Spezifische Affinität  $a_s^0$ .

$$a_s^0 = \frac{v_{max}}{K_m}$$

$v_{max}$ , Maximale Reaktionsgeschwindigkeit;  $K_m$ , Michaelis-Menten-Konstante.

Bodenaufschlammungen wurden mit sechs verschiedenen Methanolkonzentrationen versetzt (Tab. 9) und die Aktivität in den NaOH-Fallen bestimmt. Die Menge an gebildetem CO<sub>2</sub> wurde rechnerisch ermittelt (Beispielrechnung 1; 2.6.1). Zur Bestimmung der Oxidationsraten wurden die Messwerte von Tag 0, Tag 1 und Tag 3 der Inkubation herangezogen. Die Menge an oxidiertem Methanol in Mikromol pro Gramm Trockengewicht des Bodens (μmol g<sub>TG</sub><sup>-1</sup>) wurden gegen die Zeit in Tagen (d<sup>-1</sup>) aufgetragen und die Steigung der Regressionsgeraden bestimmt. Die so ermittelten Oxidationsraten in Mikromol pro Gramm Trockengewicht des Bodens und Tag (μmol g<sub>TG</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) wurden anschließend direkt gegen die Substratkonzentrationen in Mikromol pro Gramm Trockengewicht des Bodens (μmol g<sub>TG</sub><sup>-1</sup>) in den Aufschlammungen aufgetragen. Die  $v_{max}$ - und  $K_m$ -Werte wurden über die Regressionsgleichung für rechtwinklige Hyperbeln mit zwei Parametern nach Gleichung 1 bestimmt (Sigma Plot, Version 10.0, Systat Software Inc.). Die Berechnung der  $v_{max}$ -Werte



in  $\text{mM d}^{-1}$  erfolgte basierend auf dem Trockengewicht des jeweiligen Bodens und dem Ansatzvolumen (2.6.1) nach Gleichung 3.

**Gleichung 3:**  $v_{max}$  in Millimol pro Liter und Tag.

$$v_{max} (\text{mM d}^{-1}) = \frac{v_{max} (\text{mmol g}_{TG}^{-1} \text{d}^{-1}) \times TG}{Vol(l)}$$

$v_{max}$ , Maximale Reaktionsgeschwindigkeit,  $TG$ , Trockengewicht (FG: 0,4 g; HEG 6: 0,8 g; 2.6.1);  $Vol$ , Ansatzvolumen (0,005 l, 2.6.1).

## 2.6.5 Wiederfindung der Radioaktivität

Die Versuche zur Bestimmung von kinetischen Parametern (2.6.4) wurden beendet, sobald kein  $\text{CO}_2$  mehr freigesetzt wurde (HEG 6: nach 92 Tagen; FG: nach 89 Tagen). Um abschätzen zu können, wie viel Prozent des eingesetzten Methanols insgesamt dissimiliert wurde, wurde vor Beendigung der Versuche das  $^{14}\text{CO}_2$  in der Gasphase gemessen und zu den Ansätzen 100  $\mu\text{l}$  HCl (2 M) gegeben, um Carbonate als  $\text{CO}_2$  auszugasen. Anschließend wurde erneut das  $^{14}\text{CO}_2$  in der Gasphase gemessen und dann die Ansätze stehen gelassen, bis sich die festen Bestandteile abgesetzt hatten. Die Radioaktivität im Überstand wurde bestimmt und der Boden mit 5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Das Pellet wurde bei  $50^\circ\text{C}$  unter dem Abzug getrocknet und im Feststoffmodul (HAT 1200, Analytic Jena, Jena; Gerät am Lehrstuhl Agrarökosystemforschung Uni Bayreuth) eines „Total Organic Carbon“ (TOC)-Analysegerätes (multi N/C® 2100, Analytik Jena, Jena; Gerät am Lehrstuhl Agrarökosystemforschung Uni Bayreuth, Dr. Wiesenberg) 10 min lang bei  $600^\circ\text{C}$  verbrannt. Das  $\text{CO}_2$  wurde zweimal in 5 ml NaOH (1 M) aufgefangen und die Radioaktivität bestimmt.

Da die eingesetzte Radioaktivität bei Beendigung der Versuche nicht zu 100% wiedergefunden werden konnte (3.2.2), waren weitere Versuche nötig, um den Verbleib der Radioaktivität zu klären. Um zu testen, ob im Boden verbliebenes  $^{14}\text{C}$ -Methanol während des Trocknungsvorgang in den Abzug gelangte, wurden zwei Bodenaufschlammung von HEG 6 hergestellt und mit  $^{14}\text{C}$ -Methanol versetzt. Nach Messung des  $^{14}\text{CO}_2$ -Gases wurden die Ansätze stehen gelassen, bis sich die festen Bestandteile abgesetzt hatten. Die Radioaktivität des Überstandes wurde bestimmt. Zur Bestimmung der Radioaktivität des Pellets vor und nach der Trocknung wurde eine Spatelspitze Bodenmaterial (ca. 0,02 bis 0,05 g) entnommen, gewogen und in den Szintillationscocktail gegeben und gemessen. Es ist möglich, dass die Photonen durch die Bodenpartikel im Szintillationscocktail behindert werden und nicht vollständig an den Photomultipliern ankommen. Daher wurde im Vorfeld durch Zugabe verschiedener Mengen an Boden und  $^{14}\text{C}$ -Methanol zum Szintillationscocktail das Auftreten eines solchen sogenannten „Quench“ (Dämpfungs)-Effektes überprüft. Ein „Quench“-Effekt durch Bodenpartikel konnte bei den im Versuch verwendeten geringen

Bodenmengen nicht beobachtet werden. Das getrocknete Bodenmaterial wurde im Anschluss im Feststoffmodul verbrannt und die Radioaktivität bestimmt.

## 2.7 Kultivierung von Isolaten und Bestimmung der Zellzahlen

Die Gemeinschaft der Methyloprophen in oxischen Böden wurde nicht nur durch Genmarker-basierte Studien, sondern auch durch die Kultivierung von Isolaten analysiert. Beide Methoden dienen der Identifizierung dominanter Phyla und damit der Überprüfung der Hypothese 2 (1.10). Lebendzellzahlen von potenziellen Methyloprophen wurden in verschiedenen Medien bestimmt und mit uni- und multivariaten statistischen Methoden (2.10 und 2.11) ausgewertet. Der Einfluss von Vegetationstyp und Landnutzungsintensität auf die Gemeinschaft der Methyloprophen im Boden (Hypothese 3; 1.10) wurde so untersucht.

### 2.7.1 Kultivierungsmedien

Zur Gewinnung von Isolaten und zur Bestimmung der Zellzahlen wurden verschiedene feste und flüssige Medien (Tab. 10 bis Tab. 17) mit Methanol (Tab. 18) als einzige Kohlenstoffquelle hergestellt. Feste Nährmedien zur Gewinnung von Isolaten wurden durch die Zugabe von Agar (1,5%) zum Medium erhalten und das gelförmige Nährmedium in Petrischalen (Durchmesser: 3,5 cm und 5 cm; Greiner bio-one, Essen, DE) gegossen.

**Tab. 10:** Zusammensetzung des Mediums 125 (*Methylobacterium*-Medium, DSMZ) (Atlas, 2005).

Substanz	Massenkonzentration (g l <sup>-1</sup> )	Volumen- konzentration (%)	Stoffmengen- konzentration (mM)
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,02	-	0,14
KNO <sub>3</sub>	1,00	-	9,89
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,20	-	0,81
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,25	-	1,76
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,07	-	0,58
Spurenelementlösung 12	-	0,10	-

**Tab. 11:** Zusammensetzung der Spurenelementlösung für Medium 125 (Atlas, 2005).

Substanz	Massenkonzentration (g l <sup>-1</sup> )	Stoffmengenkonzentration (μM)
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,00	3,60
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,005	0,02
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,07	0,24
MoO <sub>3</sub>	0,01	0,07
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,01	0,16
MnSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,01	0,041

**Tab. 12:** Zusammensetzung des Mediums M1 (modifiziert nach Dedysh *et al.*, 1998; Atlas, 1993).

Substanz	Massenkonzentration (g l <sup>-1</sup> )	Volumen- konzentration (%)	Stoffmengen- konzentration (mM)
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,02	-	0,10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20	-	1,40
KNO <sub>3</sub>	1,00	-	10,00
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,10	-	0,40
Spurenelementlösung M1	-	0,10	-

**Tab. 13:** Zusammensetzung der Spurenelementlösung für das Medium M1.

Substanz	Massenkonzentration (g l <sup>-1</sup> )	Stoffmengenkonzentration (μM)
EDTA	5,00	13,40
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2,00	7,19
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,10	0,35
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,03	0,15
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,20	0,84
CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,10	0,59
NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,02	0,09
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,03	0,12

**Tab. 14:** Zusammensetzung der Wolfe-Vitaminlösung (Atlas, 1993).

Substanz	Massenkonzentration (g l <sup>-1</sup> )
Pyridoxinhydrochlorid (Vitamin B <sub>6</sub> )	0,01
Thiaminhydrochlorid (Vitamin B <sub>1</sub> )	0,005
Riboflavin (Vitamin B <sub>2</sub> )	0,005
Nikotinsäure (Vitamin B <sub>3</sub> )	0,005
Pantothensäure (Vitamin B <sub>5</sub> )	0,005
p-Aminobenzoesäure	0,005
Liponsäure	0,005
Biotin (Vitamin B <sub>7</sub> )	0,002
Folsäure (Vitamin B <sub>9</sub> )	0,002
Cobalamin (Vitamin B <sub>12</sub> )	0,0001

**Tab. 15:** Zusammensetzung des Mediums NMS (Whittenbury *et al.*, 1970).

Substanz	Massenkonzentration (g l <sup>-1</sup> )	Volumen- konzentration (%)	Stoffmengen- konzentration (mM)
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O (Stammlösung: 0,8 M)	-	0,1	0,8
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (Stammlösung: 0,1 M)	-	0,1	0,1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0	-	7,0
KNO <sub>3</sub>	1,0	-	10,0
Spurenelementlösung SL 10 a	-	0,1	-

**Tab. 16:** Zusammensetzung der Spurenelementlösung SL 10 a (Whittenbury *et al.*, 1970).

Substanz	Massenkonzentration (g l <sup>-1</sup> )	Volumen- konzentration (%)	Stoffmengen- konzentration (μM)
NiCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,024	-	0,10
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,002	-	0,50
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,006	-	0,10
FeCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	2,000	-	5,00
HCl (37%)	-	0,414	50,00
ZnCl <sub>2</sub>	0,068	-	0,50
MnCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,081	-	0,50
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,031	-	0,15
CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,002	-	0,01

**Tab. 17:** Zusammensetzung des Mediums M1 mod (modifiziert nach Glowik, 2008; Atlas, 1993; Dedysh *et al.*, 1998).

Substanz	Massen- konzentration (g l <sup>-1</sup> )	Volumen- konzentration (%)	Stoffmengen- konzentration (mM)
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (Stammlösung: 0,14 mM)	-	0,1	0,00014
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20	-	1,40
KNO <sub>3</sub> (Stammlösung: 0,50 M)	-	0,1	0,0005
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O (Stammlösung: 0,41 mM)	-	0,1	0,00041
Spurenelementlösung M1	-	0,1	-

**Tab. 18:** Ansätze zur Herstellung von Medien mit unterschiedlicher Methanolkonzentration.

Endkonzentration von Methanol (mM) im Medium	Stammlösung Methanol (M)	Zugegebenes Volumen (ml) der Stammlösung für 1 l Medium
0,25	2	0,25
10	2	5,00
50	10	5,00

Der pH-Wert der Medien lag bei 6,8 oder 3,1. Er wurde mit Hilfe eines pH-Meters (WTW pH 330, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, DE) eingestellt. Agar polymerisiert bei hoher Protonenkonzentration und hohen Temperaturen nicht. Zur Herstellung von Agarplatten mit einem pH-Wert von 3,1 wurde die Agarlösung getrennt vom Basismedium autoklaviert und auf etwa 50°C abgekühlt. Das Basismedium wurde optional mit steriler Vitaminlösung (Tab. 14) und Methanolstammlösung (Tab. 18) versetzt. Die Agarlösung wurde mit dem Basismedium vermischt und der pH-Wert mit steriler HCl-Lösung eingestellt.

Es wurden Medien mit unterschiedlicher Methanolkonzentration verwendet. Dazu wurden eine 2 M und eine 10 M Methanol-Stammlösungen (Tab. 18) hergestellt und über eine Polyethersulfonmembran (0,2 µm; Cronus, Camerley, UK) sterilfiltriert. Methanol hat einen niedrigeren Siedepunkt (65°C) als Wasser (100°C). Um einen Verlust von Methanol während des Autoklaviervorganges zu verhindern, wurde die filtrierte Methanol-Stammlösung nachträglich dem etwa 50°C heißem Medium zugesetzt.

Vitamine sind Wachstumsfaktoren, die in geringen Mengen für bestimmte Stoffwechselfunktionen von Mikroorganismen essentiell sein können. Sie fungieren meist als Bestandteile von Koenzymen. Der Vitaminbedarf von Mikroorganismen ist sehr unterschiedlich. Die meisten Mikroorganismen können alle Wachstumsfaktoren selbst synthetisieren, andere Mikroorganismen benötigen Vitamine in ihrer Umwelt. Das Wachstum von Methylotrophen könnte abhängig von Vitaminen im Medium sein. Daher wurde bei Bedarf zu autoklaviertem, etwa 50°C heißem Medium Vitaminlösung (10 ml l<sup>-1</sup>) gegeben. Die hitzempfindliche Vitaminlösung (Tab. 14) wurde zuvor mittels Celluloseacetat-Filter (0,2 µm; Nalgene, Rochester, US) sterilfiltriert.

Eine erste Anreicherung zur Gewinnung von Isolaten erfolgte auf festem Medium ohne Antimykotika. Es kam zu einem starken Wachstum von Pilzmyzelien. Um sichere prokaryotische Reinkulturen zu erhalten fanden alle folgenden Überimpfungen auf festem Medium mit Nystatin statt. Nystatin interagiert mit Ergosterolen der Zellmembran von Pilzen. Es entstehen Poren, durch die Kaliumionen austreten können, was den Zelltod zur Folge hat (Récamier *et al.*, 2010). Nystatin wurde steril abgewogen und 250 mg zu 1 l autoklaviertem Medium gegeben.

Die Lagerung der Nährmedien erfolgte bei 2°C. Um ein Abdampfen von Methanol zu verhindern, wurden fertige Agarplatten gasdicht in Plastiktüten verpackt und Methanolstammlösungen in gasdichten Serumflaschen gelagert. Die Vitaminlösung wurde bei -20°C aufbewahrt.

## 2.7.2 Isolierung von Reinkulturen

Erste Anreicherungen wurden in der hier vorliegenden Arbeit und im Rahmen zweier Bachelorarbeiten (Ebertsch, 2009; Glowik, 2008) hergestellt. Die Isolierungsansätze unterschieden sich hinsichtlich des Mediums, des pH-Wertes und der Methanolkonzentration (Tab.19).

**Tab. 19:** Isolierungsansätze. Allen Medien wurde Nystatin zugesetzt, um die Bildung von Pilzmyzelien zu verhindern.

Ansatz	Medium	pH-Wert	Methanolkonzentration (mM)
A	M1	6,8	0,5
B	M1	6,8	50
C	NMS	6,8	0,5
D	NMS	6,8	50
E	M1	3,1	0,5
F	M1	3,1	50
G	NMS	3,1	0,5
H	NMS	3,1	50
I	125	6,8	10

Es wurden Verdünnungsreihen der Bodenproben in flüssigem Medium erstellt. Die  $10^{-1}$  Verdünnungen der Bodenproben wurden 10 min lang mit Ultraschall (VWR Ultrasonic cleaner, VWR International GmbH, Darmstadt, DE) behandelt, um an Bodenpartikeln haftende Mikroorganismen abzulösen (Janssen *et al.*, 2002). Jeweils 25 µl der  $10^{-1}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  und  $10^{-6}$  Verdünnung wurden in Triplikaten mit Hilfe eines Drigalskispatels auf Agarplatten (Durchmesser: 3 cm) des gleichen Mediums aufgebracht. Die Inkubation erfolgte bei 20°C in Anaerobentöpfen (Werkstatt Universität Bayreuth, nach Bauplan von Prof. Dr. Frenzel, Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Abteilung Biochemie). Die Anaerobentöpfe wurden mit Sauerstoff über ein Filtersystem mit Glaswolle begast. Alle Arbeiten fanden an der Sterilbank statt. Um Reinkulturen zu isolieren, wurden Drei-Sektoren-Ausstriche auf Medium mit Nystatin durchgeführt. Mindestens drei Reinigungsausstriche wurden durchgeführt, um ein reines Isolat zu erhalten.

## 2.7.3 Bestimmung der Zellzahlen mittels MPN-Methode

Die Zellzahlen von potenziell methylotrophen Mikroorganismen wurden im Rahmen der Bachelorarbeiten von Beate Glowik (Glowik, 2008) und Linda Ebertsch (Ebertsch, 2009) mit Hilfe der „Most Probable Number“ (wahrscheinlichste Keimzahl, MPN)-Methode bestimmt (De Man, 1975). Sie wurden anhand des kleinsten Probenvolumens, in dem ein Bakterium durch seine Vermehrung nachweisbar war, abgeschätzt. Die MPN-Bestimmung erfolgte bei

20°C in 96-Well Mikrotiterplatten (Brandt, Wertheim, DE) mit verschiedenen Medien mit Methanol (10 mM) als einziger Kohlenstoffquelle (Tab. 20).

**Tab. 20:** Ansätze zur Bestimmung der Zellzahlen in Medium mit Methanol.

Ansatz	Medium	pH	[KNO <sub>3</sub> ] (mM)	Vitamine	Probenahme	Inkubation (Tage)	Referenz
1	M1 mod	3,1	0	-	April 2008	50-72	Glowik, 2008
2	M1 mod	3,1	0	+	April 2008	50-72	Glowik, 2008
3	M1 mod	3,1	0,5	-	April 2008	50-72	Glowik, 2008
4	M1 mod	3,1	0,5	+	April 2008	50-72	Glowik, 2008
5	M1 mod	6,8	0	-	April 2008	50-72	Glowik, 2008
6	M1 mod	6,8	0	+	April 2008	50-72	Glowik, 2008
7	M1 mod	6,8	0,5	-	April 2008	50-72	Glowik, 2008
8	M1 mod	6,8	0,5	+	April 2008	50-72	Glowik, 2008
9	125	6,8	1,0	-	April 2009	22	Ebertsch, 2009

Abkürzung: [KNO<sub>3</sub>], Kaliumnitratkonzentration.

Um ein Wachstum von Mikroorganismen, die nicht methylotroph sind, abzuschätzen, wurde Medium ohne Methanol eingesetzt. Es wurden 10 Replikate von  $10^{-2}$  bis  $10^{-9}$  Verdünnungen der Bodenproben hergestellt. Das Wachstum wurde anhand der Trübung des Mediums mit einem Spektralphotometer ( $\mu$ Quant Universal Microplate Spectrophotometer, BIO-Tek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, DE) bei 660 nm bestimmt. Die Inkubation erfolgte bis keine Änderung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 660 nm ( $OD_{660}$ ) messbar war. Im Rahmen der Doktorarbeit wurden die Ergebnisse der beiden Bachelorarbeiten (Ebertsch, 2009; Glowik, 2008) neu ausgewertet. Die  $OD_{660}$  zum Zeitpunkt  $t_0$  wurde von der  $OD_{660}$  nach der Inkubation ( $t_{end}$ ) abgezogen. Eine Änderung der  $OD_{660}$  um mindestens 0,03 wurde als Wachstum festgelegt (Tab. 21).

**Tab. 21:** Differenzen der  $OD_{660}$  zum Zeitpunkt  $t_0$  und  $t_{End}$  berechnet für HEG 6 und Ansatz 7 (Tab. 20). Bewachsene Zellen ( $\Delta OD_{660} > 0,03$ ) der Mikrotiterplatte wurden grau hinterlegt.

VD	Replikate									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$10^{-2}$	0,426	0,356	0,453	0,411	0,530	0,498	0,620	0,601	0,456	0,553
$10^{-3}$	0,286	0,171	0,128	0,206	0,161	0,082	0,365	0,151	0,156	0,250
$10^{-4}$	0,157	0,335	0,138	0,183	0,172	0,125	0,106	0,136	0,087	0,115
$10^{-5}$	0,001	0,090	-0,028	-0,034	-0,030	0,591	-0,061	-0,028	-0,023	-0,036
$10^{-6}$	0,002	-0,039	-0,044	-0,030	-0,023	-0,029	-0,030	-0,030	-0,034	-0,035
$10^{-7}$	0,001	-0,035	-0,052	-0,034	-0,035	-0,031	-0,030	-0,031	-0,036	-0,033
$10^{-8}$	0,000	-0,028	-0,031	-0,030	-0,032	-0,039	-0,033	-0,031	-0,029	-0,032
$10^{-9}$	-0,001	0,000	0,000	-0,002	0,000	-0,001	-0,002	0,001	-0,001	-0,001

Abkürzung: VD, Verdünnung.

Aus den höchsten drei bewachsenen Verdünnungsstufen wurde eine Zahlenkombination abgeleitet die anhand von Wahrscheinlichkeitstabellen (De Man, 1977) zur Bestimmung der MPN pro ml diente (Tab. 21, Beispielrechnung 2). Außerdem wurden die Grenzwerte bestimmt, innerhalb derer die tatsächliche Zellzahl mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% liegt (Beispielrechnung 3). Die Zellzahlen wurden auf  $g_{TG}$  normalisiert. Zellzahlen zweier Medien wurden als signifikant verschieden betrachtet, wenn die Differenz der logarithmierten Zellzahlen bei mindestens 0,516 lag (Alef, 1991).

**Beispielrechnung 2:** Bestimmung der MPN und Zellzahl pro ml.

$$\text{Zellzahl} = \frac{\text{MPN}}{\text{Verdünnung}} \times \text{Verdünnungsfaktor ml}^{-1}$$

$$\text{Zellzahl} = \frac{35}{10^{-3}} \times 20 \text{ ml}^{-1} = 7 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$$

Zahlenkombination = 10102

MPN = 35

Verdünnungsfaktor = 20

Verdünnung =  $10^{-3}$

**Beispielrechnung 3:** Bestimmung der oberen und unteren Grenzen der Zellzahlen pro ml, innerhalb derer die tatsächliche Zellzahl mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% liegt.

$\lg(\text{Konfidenzintervall}) = 0,365$

$\lg(\text{Zellzahl}) = 4,845$

$\lg(\text{obere Grenze}) = 4,845 + 0,365 = 5,210$

$\lg(\text{unteren Grenze}) = 4,845 - 0,365 = 4,480$

obere Grenze =  $1,62 \times 10^5$

untere Grenze =  $3,02 \times 10^4$

## 2.8 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Methoden eignen sich, trotz ihrer Limitationen was die detektierbare Diversität angeht (1.9), für eine schnelle und umfassende Analyse von bakteriellen Gemeinschaften und werden des Weiteren dazu genutzt, Isolate anhand ihrer 16S rRNA Gene phylogenetisch einzuordnen. Daher erfolgte in dieser Arbeit die Identifikation von Genotypen, die durch Methanolkonzentrationen im mikromolarem Bereich angeregt wurden (Ziel 2, 1.10), die Analyse der Methyloprophen in Grünland- und Waldböden (Ziel 3 und Ziel 4, 1.10) und die phylogenetische Einordnung der kultivierten Isolate (Ziel 3, 1.10) durch molekularbiologische Methoden.



### 2.8.1 DNA-Extraktion nach Stralis-Pavese

DNA-Extrakte aus Bodenproben, die für die Diversitätsstudien der Markergene *mxoF*, *fae* und *mch* benötigt wurden, wurden nach einer modifizierten Methode nach Stralis-Pavese (Stralis-Pavese *et al.*, 2004) hergestellt. Dabei wurden einige Komponenten des Fast DNA Spin for Soil Kits (BIO101, Carlsbad, US) eingesetzt. Ein mechanischer Zellaufschluss wurde mit einem enzymatischen Zellaufschluss durch Lysozym kombiniert. Es folgte eine Chloroform-Phenol-Extraktion. Das hier verwendete modifizierte Protokoll unterscheidet sich vom Originalprotokoll dadurch, dass der Lysozym-haltige Lysepuffer I für eine erste Extraktion zusätzlich 20 mg ml<sup>-1</sup> Polyvinylpyrrolidon (PVP) enthielt (Tab. 22). PVP adsorbiert Polyphenole welche eine PCR-Reaktion inhibieren können. In einem zweiten Extraktionsschritt wurde Lysepuffer II eingesetzt, der weder PVP noch Lysozym enthielt.

**Tab. 22:** Zusammensetzung des Lysepuffers I und des Lysepuffers II. Dem Lysepuffer I wurde unmittelbar vor der Verwendung Lysozym (5 g l<sup>-1</sup>) zugesetzt. Lysepuffer II wurde wie Lysepuffer I, jedoch ohne PVP und Lysozym, hergestellt.

Substanz	Massen- konzentration (g l <sup>-1</sup> )	Volumen- konzentration (%)	Stoffmengen- konzentration (mM)
CTAB	10	-	0,03
NaCl	87,7	-	1,50
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Stammlösung: 200 mM)	-	19,5	0,04
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Stammlösung: 200 mM)	-	30,5	0,06
PVP K30	20	-	0,18

Abkürzungen: CTAB, Cetyltrimethylammoniumbromid; PVP, Polyvinylpyrrolidon.

Für alle Zentrifugationsschritte wurde eine Laborzentrifuge mit dem Rotor 12132 (Sigma, Osterode am Harz, DE) verwendet. Es wurden 0,3 g<sub>FG</sub> Boden in Multimix FastPrep Gefäß (Lyse Matrix E) eingewogen und mit 780 µl Lyse Puffer I (Tab. 22) versetzt. Die Ansätze wurden für 30 min bei 37°C (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, DE) inkubiert. Es wurden 122 µl MT Puffer zugegeben. Der mechanische Aufschluss erfolgte über Beat Beating im FastPrep FP 120 Homogenisator (Bio101 Thermo Savant, Holbrook, US) für 30 s bei 5,5 ms<sup>-1</sup>. Nach Zentrifugation (15 min, 14000 rpm, 5°C) wurde der Überstand (Überstand A) abgenommen. Das Pellet wurde erneut extrahiert. Dazu wurden 500 µl Lysepuffer II (Tab. 22) und 50 µl MT Puffer zugegeben. Es folgten der mechanische Aufschluss im FastPrep FP 120 Homogenisator (30 s, 5,5 ms<sup>-1</sup>) und ein Zentrifugationsschritt (15 min, 14000 rpm, 5°C). Der Überstand (Überstand B) wurde abgenommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Überstand A und Überstand B wurden mit je 5 µl Proteinase K (10 mg ml<sup>-1</sup>) versetzt und für 30 min bei 65°C inkubiert. Es folgte eine Chloroform-Phenol-Extraktion. Dazu wurden die Proben mit 300 µl Isoamylalkohol-Chloroform (1:24) und 300 µl Phenol gemischt. Nach Zentrifugation (5 min, 14000 rpm, RT) wurde der Überstand in ein

frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 600 µl Chloroform-Isoamylalkohol (1:24) gewaschen. Zum Überstand wurden 125 µl Kalium-Acetat (7,5 M) gegeben und die Proben 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, RT) wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, 700 µl Bindematrix zugegeben und die Proben für 5 min bei 14000 rpm im Thermomixer (Comfort, Eppendorf, Hamburg, DE) geschüttelt. Die Proben wurden zentrifugiert (1 min, 14000 rpm, RT) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 500 µl SEWS Wasch-Puffer suspendiert und die Suspension A auf den Spinfilter aufgetragen. Die Proben wurden zentrifugiert (1 min, 14000 rpm, RT) und der Durchlauf verworfen. Anschließend wurde die Suspension B auf denselben Spinfilter aufgetragen und erneut zentrifugiert (1 min, 14000 rpm, RT). Der Spinfilter wurde 15 min bei 50°C getrocknet und anschließend in ein neues Auffanggefäß überführt. Die DNA wurde zweimal mit je 50 µl PCR-Wasser eluiert und die Nukleinsäurekonzentration fluoreszenzbasiert mit Hilfe des Quant-iT PicoGreen ds DNA Assay Systems (2.8.3.1) und spektrophotometrisch bestimmt (2.8.3.2). Die DNA-Extrakte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

## 2.8.2 Nukleinsäure-Extraktion nach Griffiths

Nukleinsäuren aus Bodenaufschlämmungen der Ansätze zur Bestimmung der Methanoxidation in Böden mittels  $^{14}\text{C}$ -Tracer wurden mit der Methode nach Griffiths (Griffiths *et al.*, 2000) im Rahmen einer Bachelorarbeit (Lampert, 2011) extrahiert. Ein Ziel dieser Bachelorarbeit war die Coextraktion von DNA und RNA. Daher wurde in diesem Versuch nicht die Methode nach Stralis-Pavese (2.8.1) angewandt. Bei der Coextraktion von RNA und DNA nach Griffiths wurden Nukleinsäuren mechanisch über Bead-Beating freigesetzt. Es folgte eine Chlorform-Phenol-Extraktion bei der die Proteine abgetrennt wurden. Anschließend wurde die DNA mit Ethanol gefällt (Griffiths *et al.*, 2000). Falls nicht anders angegeben, wurde für die Zentrifugationsschritte eine Laborzentrifuge mit dem Rotor 12132 (Sigma, Osterode am Harz, DE) verwendet.

Die Bodenaufschlämmungen wurden zentrifugiert (15 min, 3300 g, 4°C; Model J2-21 Zentrifuge, Beckman Coulter, Brea, US) und im weiteren Verlauf das Pellet verwendet, um höhere Nukleinsäurekonzentrationen in den Extrakten zu erhalten. 0,5 g des Pellets und 1 g einer durch Hitze-sterilisierten (12 h, 200°C) Zirkoniumbeadmischung (0,5 g Zirkoniumbeads  $\varnothing$  0,1 mm; 0,5 g Zirkoniumbeads  $\varnothing$  0,5 mm) wurden in ein 2 ml Schraubgefäß gegeben und 0,5 ml des EB Puffers (Tab. 23, Tab. 24, Tab. 25) zugesetzt.

**Tab. 23:** Zusammensetzung des EB Puffers. Von Lösung 1 (Tab. 24) und Lösung 2 (Tab. 25) wurden die gleichen Volumina zusammengegeben und auf 60 °C erhitzt.

Substanz	Stoffmengenkonzentration (M)
Kaliumphosphatpuffer (pH 8)	0,120
CTAB	0,137
NaCl	0,350

Abkürzung: CTAB, Cetyltrimethylammoniumbromid.

**Tab. 24:** Zusammensetzung des Kaliumphosphatpuffers (240 mM, pH 8) (Lösung 1).

Substanz	Massenkonzentration (g l <sup>-1</sup> )
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	42,13
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	21,93

**Tab. 25:** Zusammensetzung der CTAB-NaCl Lösung (Lösung 2).

Substanz	Massenkonzentration (g l <sup>-1</sup> )
NaCl	41
CTAB	100

Abkürzung: CTAB, Cetyltrimethylammoniumbromid.

Nach Zugaben von 0,5 ml Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) wurden die Zellen mechanisch über Beat Beating (30 s, 5,5 ms<sup>-1</sup>) aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (5 min, 16000 g, 4°C) wurde der Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 0,5 ml Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) zugegeben und erneut zentrifugiert (5 min, 16000 g, 4°C). Zum Überstand wurde das zweifache Volumen an Präzipitationspuffer PEG 6000 (Tab. 26) zugegeben und gemischt.

**Tab. 26:** Zusammensetzung des Präzipitationspuffers PEG 6000.

Substanz	Gewichtsprozent (%)	Stoffmengenkonzentration (M)
Polyethylenglykol (PEG) 6000	30	12400
HEPES (pH 7,0)		0,1

Die Nukleinsäuren wurden bei RT für 2 h präzipitiert. Nach Zentrifugation (5 min, 18000 g, 4°C) wurde das Pellet mit kaltem Ethanol (70%) gewaschen und anschließend bei 50°C getrocknet. Die DNA wurde in 55 µl PCR-Wasser gelöst und die Nukleinsäurekonzentration fluoreszenzbasiert (2.8.3.1) und spektrophotometrisch (2.8.3.2) bestimmt. Die DNA-Extrakte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

## **2.8.3 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration**

### **2.8.3.1 Fluoreszenzbasierte Bestimmung der DNA-Konzentration**

Die DNA-Konzentration der Extrakte aus Bodenproben und der PCR-Produkte wurde mit Hilfe des Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Systems (Invitrogen, Karlsruhe, DE) ermittelt. Dieses System nutzt einen Fluoreszenzfarbstoff, der in die Doppelhelix der DNA interkaliert. Die Fluoreszenz des Farbstoffs wurde mit Hilfe eines Fluorimeters (FLx800, BioTek, Bad Friedrichshall, DE) bei 480 nm gemessen. Dieses System hat den Vorteil, dass es einen Beitrag von Nukleotiden und Einzelstrang-DNA zu dem Signal minimiert. Des Weiteren wird das Signal nicht durch mit-extrahierte Kontaminationen beeinflusst.

### **2.8.3.2 Spektrophotometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration**

Die DNA-Konzentration und die Qualität der Extrakte aus Bodenproben wurden mittels Nano-Drop Spektrophotometer (ND-1000 Spektrophotometer, Paeqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE) bestimmt. Nukleinsäuren haben ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, Proteine, Phenol oder andere Kontaminationen haben ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu der Absorption bei 280 nm wurde genutzt, um die Reinheit der Extrakte abzuschätzen. Reine DNA hat ein Absorptionsverhältnis von 260 nm zu 280 nm von 1,8. Huminsäuren, EDTA, Kohlenwasserstoffe und Phenol absorbieren stark bei 230 nm. Für reine DNA liegt das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu der Absorption bei 230 nm bei 2,0 bis 2,2 (Mühlhardt, 2009).

## **2.8.4 Polymerase-Kettenreaktion**

Durch die Polymerase-Kettenreaktion („Polymerase Chain Reaction“, PCR) können DNA-Fragmente (Templates) spezifisch amplifiziert werden (Saiki *et al.*, 1988). Der Startpunkt der Replikation einer Zielsequenz (Target) wird durch zwei Oligonukleotide (Primer) festgelegt, die komplementär zu den 3`Enden des Plus-und Minusstrangs sind. Die PCR setzt sich in der Regel aus drei diskreten Schritten zusammen, die sich zyklisch wiederholen: Aufschmelzen der Template-DNA durch Hitzeeinwirkung (Denaturierung), Anlagerung der Primer an die Matrize (Annealing), Elongation der Primer über eine thermostabile Polymerase. Die Länge der PCR-Produkte wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.8.5) überprüft und die Nukleinsäurekonzentration bestimmt (2.8.3).

### 2.8.4.1 PCR-Protokolle

Aus DNA-Extrakten der Bodenaufschlammungen von HEG 6, die zur Bestimmung der Methanoloxidationsraten hergestellt wurden, wurde *mch* amplifiziert und anschließend eine Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (TRFLP)-Analyse (2.8.7) durchgeführt. So konnten Genotypen identifiziert werden, die durch die Zugabe von Methanol angeregt wurden. Der Vorwärts-Primer, *mch*-2a (Tab. 27) war am 5' Ende mit einem fluoreszierendem Farbstoff, Dy681, markiert. Die Polymerase war im 5 Prime MasterMix (5 Prime, Hamburg, DE) enthalten. Die Template-DNA war verdünntes Nukleinsäure-Extrakt (Tab. 28).

**Tab. 27:** Sequenzen und Zielgene der verwendeten Primer.

Primer	Sequenz (5'-3')	Zielgen	Position	Referenz
<i>fae1f</i> <sup>a</sup>	GTC GGC GAC GGC AAY GAR GTC G	<i>fae</i>	25-46 <sup>c</sup>	Kalyuzhnaya <i>et al.</i> , 2004
<i>fae1r</i> <sup>b</sup>	GTA GTT GWA NTY CTG GAT CTT	<i>fae</i>	385-405 <sup>c</sup>	Kalyuzhnaya <i>et al.</i> , 2004
<i>mch</i> -2a <sup>a</sup>	TGC CTC GGC TCK CAA TAT GCY GGB TGG	<i>mch</i>	242-279 <sup>c</sup>	Vorholt <i>et al.</i> , 1999
<i>mch</i> -3 <sup>b</sup>	GCG TCG TTK GTK CKB CCC AT	<i>mch</i>	706-726 <sup>c</sup>	Vorholt <i>et al.</i> , 1999
1003f <sup>a</sup>	GCG GCA CCA ACT GGG GCT GGT	<i>mxoF</i>	1003-1024 <sup>d</sup>	McDonald und Murrell, 1997
1555r <sup>b</sup>	CAT GAA BGG CTC CCA RTC CAT	<i>mxoF</i>	1555-1576 <sup>d</sup>	Neufeld <i>et al.</i> , 2007
27f <sup>a</sup>	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	16S rRNA Gen	8-25 <sup>e</sup>	Lane, 1991
1492r <sup>b</sup>	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	16S rRNA Gen	1492-1503 <sup>e</sup>	Lane, 1991

<sup>a</sup>Vorwärts gerichteter Primer

<sup>b</sup>Rückwärts gerichteter Primer

<sup>c</sup>Bezogen auf die entsprechenden Gene von *Methylobacterium extorquens* AM1

<sup>d</sup>Bezogen auf *mxoF* von *Methylobacterium organophilum* XX

<sup>e</sup>Bezogen auf das 16S rRNA Gen von *Escherichia coli*

**Tab. 28:** Reaktionsansatz der PCR zur Amplifikation von *mch* für die TRFLP-Analyse.

Reagenz	Volumen (µl)
5 Prime MasterMix <sup>a</sup> (2,5 x)	20
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2
PCR-H <sub>2</sub> O	22,6
<i>mch</i> -2a Dy681 (100 µM)	0,2
<i>mch</i> -3 (100 µM)	0,2
Template DNA <sup>b</sup>	5
Gesamt	50

<sup>a</sup>5 Prime, Hamburg, DE; Zusammensetzung: Taq DNA Polymerase (62,5 U/ml); 2,5 x Taq Reaktions Puffer (125 mM KCl; 75 mM Tris-HCl pH 8,3; 4 mM Mg<sup>2+</sup>, 0,5% Igepal® -CA360); 500 µM dNTPs; Stabilisatoren

<sup>b</sup>10<sup>-2</sup> Verdünnung des DNA-Extraktes

Die funktionellen Gene *mxoF*, *mch* und *fae* wurden aus Boden partiell amplifiziert und die Genotypendiversität mittels Amplikon-Pyrosequenzierung analysiert. Als Template-DNA dienten 5 µl der 10<sup>-2</sup> Verdünnung der DNA-Extrakte (*mch* und *fae*) bzw. 1 µl des unverdünnten DNA-Extraktes (*mxoF*) (Tab. 29). Die Primer (Tab. 27) waren am 5`Ende mit einer sechsstelligen Kennsequenz (z.B. ACACAC für den Boden AEG 2) spezifisch für jeden Boden markiert, um die Sequenzen den entsprechenden Bodenproben zuordnen zu können. Man bezeichnet dieses Verfahren auch als „barcoded primer PCR“ (Parameswaran *et al.*, 2007). Durch dieses Vorgehen wird ein nachträglicher Ligationsschritt zur Markierung von Sequenzen im Zuge der Pyrosequenzierung unnötig.

In dieser Arbeit wurde die PCR auch zur partiellen Amplifikation der 16S rRNA Gene zur phylogenetischen Einordnung der Isolate durchgeführt. Einzelne Kolonien der Isolate wurden direkt in die PCR eingesetzt (Tab. 29).

**Tab. 29:** PCR-Ansätze zur Amplifikation von Teilsequenzen der funktionellen Gene *mxoF*, *mch* und *fae* für die Amplikon-Pyrosequenzierung und PCR-Ansätze zur Amplifikation der 16S rRNA Gene der Isolate.

	<i>mxoF</i>	<i>mch</i>	<i>fae</i>	16S rRNA Gen
	Primer: mxaf1003/ 1555r	Primer: mch-2a/mch-3	Primer: fae1f/fae1r	Primer: 27f/1492r
Reagenz	Volumen ( $\mu$ l)	Volumen ( $\mu$ l)	Volumen ( $\mu$ l)	Volumen ( $\mu$ l)
5 Prime MasterMix <sup>a</sup> (2,5 x)	-	-	-	20
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	-	-	-	2
Master Amp PCR Premix F <sup>b</sup> (2 x)	-	25	25	-
BSA (3%)	-	-	-	2
Phusion HF Puffer <sup>c</sup> (5 x)	10	-	-	-
Taq Polymerase <sup>d</sup> (5 U $\mu$ l <sup>-1</sup> )	-	0,15	0,15	-
DMSO (100%)	1,5	-	-	-
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5	-	-	-
dNTPs (2,5 mM)	4	-	-	-
PCR-H <sub>2</sub> O	25,5	9,85	9,85	22
Vorwärtsprimer (10 $\mu$ M)	3	5	5	2
Rückwärtsprimer (10 $\mu$ M)	3	5	5	2
Phusion DNA Polymerase <sup>c</sup>	0,5	-	-	-
Template DNA	1 <sup>f</sup>	5 <sup>e</sup>	5 <sup>e</sup>	Kolonie
Gesamt	50	50	50	50

<sup>a</sup>5 Prime, Hamburg, DE; Zusammensetzung: Taq DNA Polymerase (62,5 U/ml); 2,5 x Taq Reaktions Puffer ( 125 mM KCl; 75 mM Tris-HCl pH 8,3; 4 mM Mg<sup>2+</sup>, 0,5% Igepal® -CA360); 500  $\mu$ M dNTPs; Stabilisatoren

<sup>b</sup>Epicentre Biotechnologies, Madison, US; Zusammensetzung: 100 mM Tris-HCl pH 8,3; 100 mM KCl; 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 400  $\mu$ M dNTPs

<sup>c</sup>New England Biolabs Inc., Ipswich, US

<sup>d</sup>Invitrogen, Karlsruhe, DE

<sup>e</sup>10<sup>-2</sup> Verdünnung des DNA-Extraktes

<sup>f</sup>Unverdünntes DNA-Extrakt

Die PCR wurde in vorgeheizten Thermocyclern (Biometra Tgradient Thermoblock, Biotron, Göttingen, DE; PeqLab Primus 96, Peqlab Biotechnologie, Erlangen, DE; Sensoquest Labcycler, Sensoquest, Göttingen, DE) durchgeführt. Alle hier verwendeten Thermoprotokolle (Tab. 30) wurden angepasst (2.8.4.2), um eine hohe Ausbeute zu erreichen. Bei der *mxoF*-PCR wurde, wie vom Hersteller der hier verwendeten Phusion-High-Fidelity Polymerase (New England Biolabs Inc., Ipswich, US) empfohlen, der Annealing-Schritt mit dem Elongationsschritt kombiniert. Dies wird empfohlen, da die Schmelztemperatur der Primer ( $T_m$  = 80°C,  $T_m$  Berechnung über den NEB  $T_m$  Rechner, <http://www.neb.com/TmCalculator>) über 72°C liegt. Die PCR besteht folglich aus nur zwei Schritten, die zyklisch wiederholt werden. Bei der *mch*- und *fae*-PCR für die Amplikon-Pyrosequenzierung handelte es sich um eine „Touchdown“-PCR (Tab. 30). Das schrittweise Erniedrigen der Annealing-Temperatur begünstigt die Amplifikation spezifischer Produkte (Hecker und Roux, 1996).

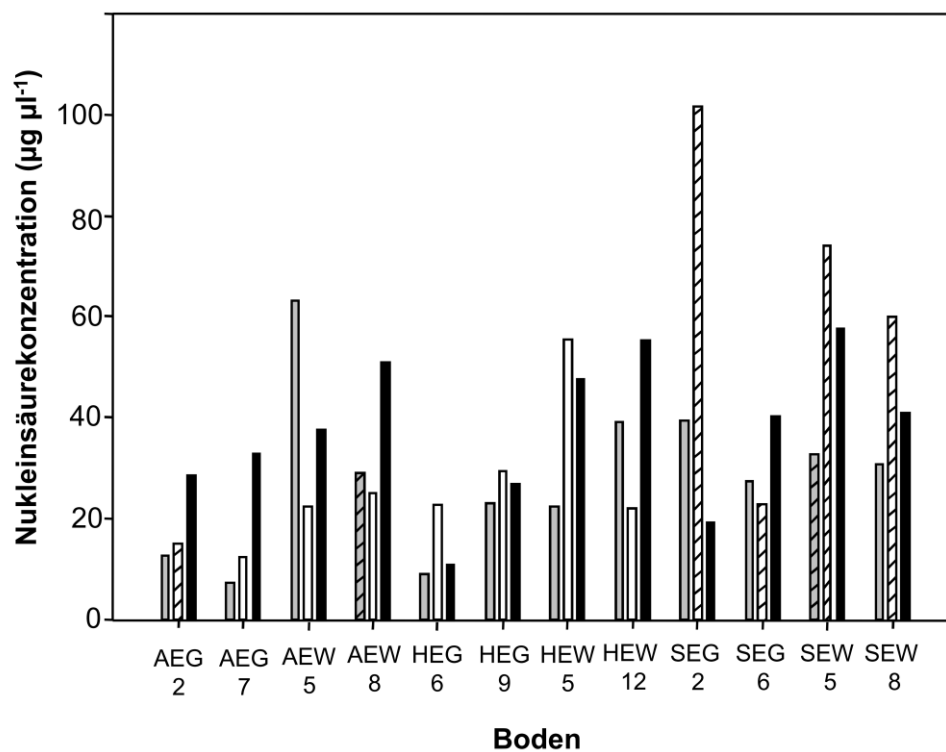
**Tab. 30:** Thermoprotokolle zur Amplifikation von Teilsequenzen der Gene *mxoF*, *mch*, *fae* und des Gens für die 16S rRNA.

Schritt	<i>mxoF</i>	<i>mch</i> und <i>fae</i>	16S rRNA Gen
1. Initiale Denaturierung	98°C/1min	95°C/10 min	95°C/5 min
2. Denaturierung		95°C/0,5 min	95°C/1 min
3. Annealing		55–45°C/0,5 min	40°C/1 min
4. Elongation		72°C/1,3 min	72°C/3 min
5. Anzahl der Wiederholungen des Zyklus 2. bis 4.		20	6
6. Denaturierung	98°C/0,6 min	95°C/0,5 min	95°C/1 min
7. Annealing	72°C/0,5 min	45°C/0,5 min	43°C/1 min
8. Elongation		72°C/1,3 min	72°C/3 min
5. Anzahl der Wiederholungen der Schritte 6. bis 8.	35	37	36
8. End-Elongation	72°C/6 min	72°C/10 min	72°C/5 min

#### 2.8.4.2 Optimierung der Amplifikation von *mxoF*

Verschiedene PCR-Parameter wurden in dieser Arbeit und im Rahmen von vier Bachelorarbeiten (Ebertsch, 2009; Hetz, 2010; Lampert, 2011; Thamm, 2008) angepasst und so die Ausbeute und die Qualität der PCR-Produkte verbessert. Der Erfolg der PCR hängt von der Template-Qualität und -Quantität ab. Die PCR erfolgte mit möglichst frischen Extrakten, um eine Schädigung des Templates während der Lagerung auszuschließen (Lee *et al.*, 2010 a). An den Bodenproben von 2008 wurden in einem ersten Vorversuch drei verschiedene Protokolle zur DNA-Extraktion getestet: Der PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, US), die Nukleinsäureextraktion nach Griffiths (Griffiths *et al.*, 2000) (2.8.2) und die DNA-Extraktion nach Stralis-Pavese (Stralis-Pavese *et al.*, 2004) (2.8.1). Ziel war es ein Protokoll zu finden, das zu einer erfolgreichen Amplifikation von *mxoF* führt. Die DNA-Extraktion nach Stralis-Pavese mit anschließender PCR lieferte *mxoF*-Amplifikate von allen 12 getesteten Böden (Abb. 6). Dieses Extraktionsprotokoll wurde verwendet, um DNA-Extrakte zur Analyse der Genotypendiversität von *mxoF*, *mch* und *fae* herzustellen.





**Abb. 6:** Zusammenfassung der Ergebnisse der DNA Extraktion aus 0,5 g<sub>FG</sub> Boden durch verschiedene Extraktionsprotokolle und anschließender *mxnF*-Amplifikation. Graue Säulen, PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, US); Weiße Säulen, Coextraktion von RNA und DNA (Griffiths *et al.*, 2000); Schwarze Säulen, Extraktion nach Stralis-Pavese (Stralis-Pavese *et al.*, 2004). Schraffierte Säulen, keine *mxnF*-Amplifikation; Säulen ohne Schraffur, *mxnF*-Amplifikation war möglich.

Bestimmte PCR-Zusätze können die PCR-Ausbeute erhöhen (Mülhardt, 2009). Es wurden Dimethylsulfoxid (3%, 5%, 7,5%, 10%; DMSO) und Glycerin (10%) eingesetzt, um der Bildung von Sekundärstrukturen in der Template- und Primer-DNA entgegenzuwirken. Diese können die Effizienz der PCR verringern, indem sie den Zugang zu Primerbindungsstellen behindern und so keine Amplifikation stattfinden kann. Aufgrund von komplementären Sequenzabschnitten innerhalb der Nukleinsäuren, kann es zur Ausbildung von solchen Sekundärstrukturen kommen (Geiduschek und Herskovits, 1961). Tween 20 (2,5%) wurde eingesetzt, um die inhibitorischen Effekte von geringen Mengen an stark ionischen Detergenzien wie SDS zu verhindern (Gelfand und White, 1990). Die Wirkung von Rinderserumalbumin (BSA) (400 µg/ml) wurde getestet. Dieser Zusatz ist bekannt dafür, dass er die Stabilität der DNA-Polymerase erhöhen kann und einem Anheften der PCR-Reagenzien an die Wand des Reaktionsgefäßes entgegenwirkt (Mülhardt, 2009). Eine weitere Strategie war es, kommerzielle Enhancer-Systeme wie z.B. den 5 Prime *Taq*Master PCR Enhancer (5 Prime, Hamburg, DE) einzusetzen. Die Polymerase soll so weniger sensitiv gegenüber PCR-inhibierenden Kontaminationen werden.

Huminsäuren kommen natürlicherweise im Boden vor. Sie werden während biologischer Abbauprozesse gebildet. Solche Huminsäuren können als Kontamination der Template-DNA die PCR inhibieren (Mülhardt, 2009). Es wurden PCR-Analysen durchgeführt, bei denen zusätzlich zur Template-DNA aus den Bodenproben reine *Methylococcus capsulatus* DNA eingesetzt wurde. So kann herausgefunden werden, ob die PCR durch Huminsäuren gehemmt wird. Eine Strategie war es, die Extrakte in verschiedenen Verdünnungsstufen (unverdünnt,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) in die PCR einzusetzen. Bei höherer Verdünnung wurde so nicht nur die DNA-Konzentration sondern auch die Konzentration der Inhibitoren erniedrigt. DNA-Extrakte, die auf Grund der gelblichen Färbung sehr wahrscheinlich durch Huminsäuren verunreinigt waren, wurden mit dem PowerClean®DNA Clean-Up Kit (Mo Bio Laboratories Inc, Carlsbad, US) nach Herstellerangaben behandelt.

In den Bachelorarbeit von Christopher Thamm (Thamm, 2008), Linda Ebertsch (Ebertsch, 2009) und Stefanie Hetz (Hetz, 2010) wurden DNA-abhängige Taq-DNA-Polymerasen eingesetzt. Sie wurden entweder zum PCR-Ansatz mit Master Amp PCR Premix F zugegeben oder waren bereits im 5 Prime MasterMix enthalten. Taq-DNA-Polymerasen besitzen keine 3'-5' Exonuklease-Aktivität und haben daher keine Korrekturlese-Funktion („proof reading“). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Polymerase MyTaq™ (Bioline GmbH, London, UK), AccuPrime™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Karlsruhe, DE) und DyNAzyme™ EXT (Finnzymes, Espoo, FI) getestet. In der Bachelorarbeit von Niclas Lampert (Lampert, 2011) wurden die Deep VentR und One Taq Hot Start Polymerasen (New England Biolabs Inc., Ipswich, US) und die Phusion®High Fidelity Polymerase (New England Biolabs Inc., Ipswich, US) eingesetzt. Die letzten fünf der hier genannten Polymerasen besitzen eine 3'-5' Exonuklease-Aktivität. Falsch eingebaute Nukleotide werden dadurch entfernt. Zur Amplifikation von Teilsequenzen des Gens *mxnF* wurden der Primer f1003 und die Primer 1555r und 1561r (McDonald und Murrell, 1997) getestet. Es gibt Hinweise darauf, dass mit Hilfe des Primers 1555r ein breiteres Spektrum an Methanoldehydrogenase-Genen erkannt wird als mit 1561r (Neufeld *et al.*, 2007). PCR Analysen wurden sowohl mit frischen als auch mit bis zu 2 Jahre gelagerten Primern durchgeführt und eine Beeinflussung durch die Lagerung ausgeschlossen.

Polymerasen benötigen Magnesium im aktiven Zentrum. Chelat-bildende Reagenzien wie z.B. Ethylendiamintetraacetat (EDTA) reduzieren die Konzentration an frei gelöstem Magnesium. Gleichzeitig kann ein Magnesiumüberschuss zur Amplifikation unspezifischer Produkte führen (Williams, 1989; Ellsworth *et al.*, 1993). In dieser Arbeit und in einer Bachelorarbeit (Lampert, 2011) wurden verschiedene Magnesiumkonzentrationen im Bereich von 1,5 mM bis 4 mM getestet. Des Weiteren wurden verschiedene Primerkonzentrationen (0,2 mM bis 2,5 mM) eingesetzt und die Polymerasekonzentration verändert.

Die Thermoprotokolle wurden hinsichtlich der Zyklenzahl (35 bis 45), der Temperatur und der Dauer der einzelnen Schritte angepasst. Ein Temperatur-Gradient zwischen 50°C und 60°C wurde angelegt und so die optimale Annealing-Temperatur bestimmt. Es wurden Analysen

mit und ohne „Touchdown“ durchgeführt. Die schließlich in dieser Doktorarbeit angewandten PCR-Protokolle sind in (2.8.4.1) dargestellt.

## 2.8.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Länge der PCR-Produkte wurde mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese überprüft (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurde ein 1%-iges (w/v) Agarosegel mit Tris-Acetat-EDTA-(TAE)-Puffer (Tab. 31) der Firma Millipore (Millipore, Bedford, US) und einem interkalierendem Fluoreszenzfarbstoff, Ethidiumbromid (Endkonzentration: 50 ng ml<sup>-1</sup>; Bio-Rad, Hercules, US), hergestellt.

**Tab. 31:** Zusammensetzung des TAE-Puffers der Firma Millipore (Millipore, Bedford, US).

Substanz	Stoffmengenkonzentration (M)
Tris-HCl	0,04
Essigsäure	0,02
EDTA	0,001

Die PCR-Produkte wurden mit 6 x Ladepuffer versetzt und die Geltaschen beladen. Als Längenstandart diente MWM-1 (Bilatec, Mannheim, DE). Eine Spannung von 90 V wurde angelegt um die negativ geladenen Nukleinsäuren durch die Gelmatrix zu ziehen. Nukleinsäurebanden wurden durch UV-Bestrahlung (302 nm) auf einem UV-Tisch (UCT-20M, Herolab GmbH, Wiesloch, DE) sichtbar gemacht und photographisch mit der Digitalkamera Canon PowerShot G5 (Canon, Krefeld, DE) und der Software Remote Capture dokumentiert.

## 2.8.6 Reinigung der PCR-Produkte von *mxoF*, *mch* und *fae*

Die PCR-Produkte für die Amplikon-Pyrosequenzierung (2.8.9) und für die TRFLP-Analyse (2.8.7) wurden über Agarose-Gelelektrophorese (2.8.5) mit einem modifiziertem TAE-Puffer (Tab. 32) der Firma Millipore (Millipore, Bedford, US) aufgetrennt und anschließend ausgeschnitten. Dieser Arbeitsschritt diente dazu, unspezifische PCR-Produkte zu entfernen.

**Tab. 32:** Zusammensetzung des modifizierten TAE-Puffers der Firma Millipore (Millipore, Bedford, US).

Substanz	Stoffmengenkonzentration (M)
Tris-HCl	0,04
Essigsäure	0,02
EDTA	0,0001

Der modifizierte TAE-Puffer hatte eine geringere EDTA-Konzentration als regulärer TAE-Puffer. Die geringe EDTA-Konzentration sollte verhindern, dass die  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration in nachfolgenden Sequenzierungsreaktionen und damit der Sequenzierungserfolg beeinflusst wird.

PCR-Produkte der richtigen Länge wurden mit einem sauberen Skalpell auf dem UV-Tisch ausgeschnitten. Dabei wurde darauf geachtet, dass die DNA möglichst kurz der UV-Strahlung ausgesetzt war, um die Bildung von Thymindimeren zu unterbinden. Anschließend wurde die DNA mit einem Extraktionskit (Montage Gel Extraction Kit, Millipore, Bedford, US) nach Herstellerangaben behandelt.

### 2.8.7 TRFLP-Analyse zur Identifizierung von Methanol-induzierten Genotypen

Die Bodenaufschlammungen zur Bestimmung der kinetischen Parameter (Tab. 9) wurden zeitgleich noch einmal ohne die Zugabe von  $^{14}\text{C}$ -Methanol angesetzt, aber die gleiche Konzentration  $^{12}\text{C}$ -Methanol zugefügt. Die Ansätze wurden in regelmäßigen Abständen belüftet. Zum Zeitpunkt  $t_0$  (nach 0 Tagen) und zum Zeitpunkt  $t_{\text{End}}$  (nach 92 Tagen für HEG 6, nach 89 Tagen für FG) wurden Proben der Bodenaufschlammungen bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Mit diesen Proben wurde eine Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus („Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism“, TRFLP)-Analyse durchgeführt. Es handelt sich bei der TRFLP-Analyse um eine „Fingerprint“-Methode bei der Unterschiede in der Sequenz als Restriktionsfragment-Muster durch Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden (Liu *et al.*, 1997; Schütte *et al.*, 2008). So wurden Genotypen identifiziert, die durch die Zugabe von Methanol aktiviert wurden.

In Rahmen der Bachelorarbeit von Niclas Lampert wurden Nukleinsäuren mit Hilfe der Methode nach Griffiths (Griffiths *et al.*, 2000) aus den Bodenaufschlammungen extrahiert (2.8.2). Es folgte die Amplifikation von *mch* aus den Bodenaufschlammungen von HEG 6 (Tab. 28, Tab. 30). Eine Amplifikation von funktionellen Genen aus den Bodenaufschlammungen von FG und die Amplifikation von *mxnA* und *fae* aus den Bodenaufschlammungen FG, OG und HEG 6 gelangen nicht. Die Länge der PCR-Produkte wurde überprüft (2.8.5) und die Amplifikate gereinigt (2.8.6). Anschließend wurde ein Verdau mit Mung Bean Nuklease (Tab. 33) durchgeführt, um die Bildung sogenannter Pseudo-TRFs zu vermeiden. Während der PCR entstehen teilweise einzelsträngige Amplikons. Diese einzelsträngigen terminalen Restriktionsstellen können nicht durch Endonukleasen geschnitten werden. „Pseudo“-terminale Restriktionsstellen im Leseraster abwärtsgelegen von der eigentlichen Restriktionsstelle werden durch die TRFLP-Analyse detektiert (Egert und Friedrich, 2003). Der Verdau wurde durch Filtrieren mit Hilfe des Millipore 96- Well Filtration Systems (MultiScreen HTS, Millipore Corporation, Billerica, US) gestoppt.

**Tab. 33:** Ansatz für den Verdau mit Mung Bean Nuklease. Der Ansatz wurde 1 h bei 30°C inkubiert.

Reagenz	Volumen (µl)
Mung Bean Nuklease <sup>a</sup> (2 U/µl)	1
NEB Puffer 2 <sup>a</sup> (10 x)	5,5
Probe	50

<sup>a</sup>New England Biolabs Inc, Ipswich, US

Es folgte der Restriktionsverdau durch das Restriktionsenzym BslI (New England Biolabs Inc, Ipswich, US) (Schnittstelle: 5'CCNNNNN/NNGG 3' bzw. 3'GGNN/NNNNNCC 5') (Tab. 34). Die DNA-Fragmente wurden über denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Gelbilder wurden mit Hilfe der Software GelQuest (Sequentix-Digital DNA Processing, Klein Raden, DE) ausgewertet.

**Tab. 34:** Ansatz für den Verdau mit den Restriktionsenzymen BslI. Die Inkubationszeit war 4 h. Die Inkubationstemperatur war 55°C.

Reagenz	Volumen (µl)
Restriktionsenzym (2 U/µl)	1
NEB Puffer 3 (BslI) bzw. 4 (MspI) <sup>a</sup> (10 x)	0,7
Probe	5

<sup>a</sup>New England Biolabs Inc, Ipswich, US

Es wurde eine Genbank hergestellt und so die TRFs bestimmten Genotypen zugeordnet. Dazu wurde *mch* aus Bodenaufschlämmungen mit Methanol mit nicht-fluoreszenzmarkierten Primern amplifiziert. Die *mch*-PCR-Produkte wurden in ein gemeinsames Reaktionsgefäß überführt und durch die LGC Genomics GmbH (Berlin, DE) eine TA-Klonierung in kompetenten *Escherichia coli* Zellen durchgeführt. 96 Insertionssequenzen in transformierten Plasmidvektoren wurden sequenziert (LGC Genomics GmbH, Berlin, DE). Die Sequenzinformationen wurden genutzt, um TRFs bestimmten *mch*-Genotypen zuzuordnen. Dazu wurden *mch*-Sequenzen aligned und hypothetische TRFs bestimmt. Die detektierten TRFs wurden mit den hypothetischen TRFs abgeglichen und konnten so bestimmten *mch*-Sequenzen zugeordnet werden.

### 2.8.8 Taxonomische Einordnung der Isolate

Die Isolate wurden anhand ihrer 16S rRNA Gensequenz taxonomisch eingeordnet. Dazu wurde das 16S rRNA Gen partiell über Kolonie-PCR (2.8.4.1) amplifiziert. Zellmaterial wurde mit einem autoklaviertem Zahnstocher entnommen und in die PCR-Reaktionsgefäße überführt. Die Länge der Amplifikate wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

(2.8.5). Die PCR-Produkte wurden mittels PCR Purification Kit (Quiagen, Hilden, DE) oder über ein Filterplatten-System (Millipore Multiscreen HTS, Millipore Corporation, Bedford, US) nach Herstellerangaben gereinigt. Die DNA wird dabei selektiv an eine Membran gebunden. Andere Substanzen wie Enzyme oder dNTPs können die Membran ungehindert passieren. Anschließend wurde die DNA mit Wasser eluiert (Mülhardt, 2009).

Die gereinigte DNA-Amplifikate wurden sequenziert (Macrogen, KS) und die Sequenzen mit Hilfe der Software Bellerophon (URL: <http://comp-bio.anu.edu.au/bellerophon/bellerophon.pl>; Huber *et al.*, 2004) einem Test auf Chimären-Bildung unterzogen. Eine Chimären-Sequenz besteht aus zwei oder mehr phylogenetisch distinkten Elternsequenzen. Sie entsteht während der PCR, wenn ein DNA-Strang eines unvollständigen Amplikons sich mit einem DNA-Strang eines anderen Amplikons zusammenlagert. Anschließend wurde eine BLAST („Basic Local Alignment Search Tool“-Analyse durchgeführt (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), um verwandte Sequenzen zu identifizieren. Beim BLAST-Algorithmus handelt es sich um einen heuristischen Ansatz, der auf einer Approximation des Smith-Waterman-Algorithmus basiert (Altschul *et al.*, 1990).

## **2.8.9 Analyse der funktionellen Genmarker *mxoF*, *mch* und *fae* mittels Amplikon-Pyrosequenzierung**

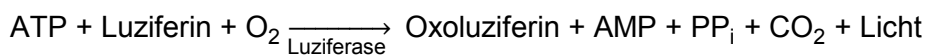
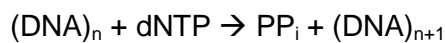
### **2.8.9.1 Amplikon-Pyrosequenzierung**

Seit der Entwicklung der Sangersequenzierung im Jahr 1977 (Sanger *et al.*, 1977) wurden neue sogenannte „next generation sequencing“-Technologien (Sequenzierungstechnologien der nächsten Generation), darunter auch die Pyrosequenzierungstechnologie (Margulies *et al.*, 2005) hervorgebracht. Diese erlaubt einen höheren Probendurchsatz und ist preislich günstiger als die Sangersequenzierung. Mit Hilfe der ersten kommerziell verfügbaren 454-Sequenzierungsapparatur, dem GS-20 Sequenzer, konnten insgesamt etwa 20 MBp an 110 Bp langen Sequenzstücken in einem 8 h Lauf produziert werden (Margulies *et al.*, 2005). Bis zum Jahr 2012 wurde diese Technologie weiterentwickelt, so dass heute mit Hilfe des FLX/Titanium-Systems insgesamt 1,1 GBp mit bis zu 1000 Bp langen Sequenzstücken in einem Lauf hergestellt werden können (LGC Genomics, 2013).

Der erste Schritt der Pyrosequenzierung ist die Herstellung einer DNA-Bibliothek aus Adapter-gebundenen Einzelsträngen. Bei den Adaptermolekülen handelt es sich um Oligonukleotide. Sie stellen die Startpunkte für die nachfolgenden Amplifikations- und Sequenzierungsreaktionen dar. Einer der beiden Adaptern hat Biotin kovalent gebunden. Die mit Biotin markierten Nukleinsäuremoleküle können nach dem Prinzip der Affinitätschromatographie gereinigt werden. Die Adapter-gebundenen Einzelmoleküle werden einzeln an sogenannten Capture-Beads verankert. Die Amplifikation der Einzelmoleküle erfolgt über eine Emulsions-PCR innerhalb von Emulsionstropfen. Die Capture-Beads mit den amplifizierten DNA-Fragmenten werden anschließend auf die Zellen

eines PicoTiter-Trägers aufgebracht. Dabei gilt, dass lediglich ein Capture-Bead mit klonal amplifizierter DNA pro Zelle enthalten sein darf. In den Zellen erfolgt die Sequenzierung unter DNA-Synthese. Bei der Synthese wird Pyrophosphat abgespalten. Dieses Pyrophosphat reagiert zusammen mit Adenosin-5'-Phosphosulfat und dem Enzym ATP-Sulfurylase zu ATP. ATP und Luziferin reagieren unter Lichtemission zusammen mit dem Enzym Luziferase zu Oxoluziferin (Reaktionsschema). Nicht eingebaute Nukleotide und ATP werden durch Apyrase abgebaut. Die Reaktion kann dann erneut mit einem anderen Nukleotid durchgeführt werden (Rothberg und Leamon, 2008).

Reaktionsschema:



(nach Rothberg und Leamon, 2008)

In dieser Arbeit wurden im Jahr 2009 zu vier verschiedenen Zeitpunkten (April, Juni, August, Oktober) Bodenproben genommen (2.2) und DNA extrahiert (2.8.1). Teilsequenzen von *mxoF*, *mch* und *fae* wurden nach dem Prinzip der „barcoded primer PCR“ (2.8.4.1) amplifiziert. Die Länge der PCR-Produkte wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.8.5) überprüft. Anschließend wurden die PCR-Produkte aufgereinigt (2.8.6) und durch die Zugabe von hohen Salzkonzentrationen und Isopropanol präzipitiert. Dazu wurde das Eluat mit 0,7 x Volumen Isopropanol (140 µl) und 0,1 x Volumen NaCl (5 M) gemischt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Nach Zentrifugation (15°C, 18000 x g, 1 h) wurde das Pellet mit 0,7 x Volumen eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen und erneut zentrifugiert (15 °C, 18000 x g, 1 h). Das Pellet wurde 15 min im Heizblock bei 50 °C getrocknet und in 20 µl PCR-ddH<sub>2</sub>O gelöst.

Nach der Reinigung und der Fällung wurden die PCR-Produkte mit dem PreCR Repair Mix (New England Biolabs Inc., Ipswich, US) nach Herstellerangaben behandelt. Bei dem PreCR Repair Mix handelt es sich um eine Mischung aus Enzymen, die beschädigte DNA reparieren soll. Eine solche Schädigung können z.B. Thymindimere sein (Särkinen *et al.*, 2012). Anschließend wurde die DNA-Konzentration fluoreszenzbasiert bestimmt (2.8.3.1).

Die Pyrosequenzierung von *fae* und *mch* erfolgte über den Dienstleister LGC (LGC Genomics GmbH, Berlin, DE). Dazu wurde eine Mischprobe der Amplifikate von *mxoF*, *mch* und *fae* angefertigt. Die Sequenzierung von *mxoF* erfolgte über das Unternehmen Göttingen Genomics Laboratory (Universität Göttingen; Prof. Dr. Rolf Daniel, DE). In diesem Fall wurde

keine Mischprobe mit anderen Genen angefertigt, da die Anzahl der erhaltenen *mxoF*-Sequenzen nicht zufriedenstellend war, sobald *mxoF*-Amplikons mit *mch*- und *fae*-Amplikons gemischt waren.

### 2.8.9.2 Bereinigung des Sequenzdatensatzes

Die Pyrosequenzierung ist eine Methode, bei der an die Stelle der Klonierung eine Emulsions-PCR tritt (2.8.9.1). Zwar ist die Fehlerrate bei der Pyrosequenzierung vergleichbar mit der der Sangersequenzierung (Quince *et al.*, 2011), eine Wiederholung der Sequenzierung wie bei der Klonierung ist jedoch nicht möglich. Es ist daher nötig, fehlerhafte Sequenzen auszusortieren. Die Qualität der in dieser Arbeit erhaltenen Sequenzen wurde mit Hilfe des *Phred* Algorithmus geprüft (Ewing *et al.*, 1998). Es wurden nur Sequenzen mit einem *Phred* Qualitätswert über 20 verwendet. Ein solcher Q20 Wert bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit, dass eine falsche Base eingebaut wurde, bei 1 zu 100 liegt.

Fehlsequenzierungen entstehen bei der Pyrosequenzierung vor allem bei der Sequenzierung von Homopolymeren, wenn die tatsächliche Homopolymer-Länge nicht richtig erkannt wird (Quince *et al.*, 2009). Die Sequenzen wurden nach der *Phred*-Analyse mit dem Programm AmpliconNoise gefiltert. Dieses Programm vereinigt PyroNoise, das die „flowgrams“, also Muster der aufgenommenen Lichtintensitäten, gruppiert, mit der Anwendung von SeqNoise, zur Herstellung eines Sequenz-basierten Alignments. Als fehlerhaft erkannte Sequenzen wurden identifiziert und aus dem Datensatz entfernt (Quince *et al.*, 2011). *mxoF*-Datensätze wurden im Rahmen dieser Arbeit mit AmpliconNoise behandelt, *mch*- und *fae*-Datensätze wurden von Dr. Charles K Lee (Faculty of Science and Engineering, University of Waikato, NZ) gefiltert.

Es wurden nur die Sequenzen weiter analysiert, die den vorwärts-gerichteten Primer enthielten. Die Sequenzen wurden, basierend auf den berechneten Cut-Off-Werten (2.8.9.3), mit dem Programm JAguc (Version 2.1; Nebel *et al.*, 2011) mit Hilfe des „average neighbor clustering“ Algorithmus in „Operational Taxonomic Units“ (OTUs) zusammengefasst (Nebel *et al.*, 2011). Die repräsentativen Sequenzen der OTUs wurden mit Hilfe von BLAST (Altschul *et al.*, 1990) identifiziert. Dazu wurden die BLAST Einstellungen modifiziert (blastn, Erwartungswert E=100). OTUs, die keine Verwandtschaft zu den entsprechenden Zielgenen zeigten, wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die Endzahl der gefilterten Sequenzen unterschied sich in den verschiedenen Böden. Mit Hilfe der Software QIIME (Caporaso *et al.*, 2010) wurden Sequenzen zufällig ohne zurücklegen gezogen. So wurden rarefizierte OTU-Plot-Matrizen generiert, wobei die Wahl der Probengröße auf der kleinsten Anzahl an Sequenzen pro Boden basierte (Tab. 47). Für jedes OTU wurde eine repräsentative Sequenz gewählt, *in silico* translatiert und anschließend in einen phylogenetischen Baum eingerechnet (2.9). Die phylogenetischen Bäume wurden genutzt, um die OTUs bekannten Organismen zuzuordnen. Alle repräsentativen Sequenzen der rarefizierten Datensätze wurden in der zentralen Datenbank des Europäischen Bioinformatik-



Instituts (European Bioinformatics Institute, EBI) mit den „Accession“-Nummern HE970319 bis HE970434 hinterlegt.

### 2.8.9.3 Berechnung von Cut-Off-Werten zur Differenzierung von OTUs

Artnamen sind zur Benennung von Sequenzen nicht zulässig. Um den Artenreichtum von Methyloprophen abzuschätzen, wurden *mxoF*-, *mch*- und *fae*-Teilsequenzen anhand von Distanz-basierten Grenzwerten (Cut-Off-Werten) in OTUs gruppiert. Es wurden zwei verschiedene Typen von Cut-Off-Werten berechnet: ein Cut-Off zur Differenzierung von OTUs auf Speziesebene (2.8.9.3.1), um die Phylogenie der 16S rRNA Gene widerzuspiegeln, und ein Datensatz-basierter Cut-Off (2.8.9.3.2).

#### 2.8.9.3.1 Berechnung eines Cut-Off-Wertes zur Differenzierung von OTUs auf Speziesebene

60 *mxoF*-Sequenzen (Tab. 35), 8 *mch*-Sequenzen (Tab. 36) und 11 *fae*-Sequenzen (Tab. 37) wurden zusammen mit den entsprechenden 16S rRNA Gensequenzen analysiert. Die Sequenzen der funktionellen Gene wurden *in silico* in die entsprechenden Aminosäuresequenzen translatiert und mit dem in MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) implementierten Programm ClustalW aligned (Kumar *et al.*, 2008). 16S rRNA Gensequenzen wurden über den SINA Alignment-Service (v1.2.9, URL: <http://www.arb-silva.de/aligner/>) aligned (Pruesse *et al.*, 2012). Es wurde eine Distanzmatrix für sowohl *mxoF*-, *mch*-, *fae*- und 16S rRNA Gensequenzen als auch für die translatierten Aminosäuresequenzen hergestellt. In die Berechnung gingen diejenigen Sequenzabschnitte ein, die von den entsprechenden Primersequenzen flankiert wurden. Der Ähnlichkeitskoeffizient S zweier Sequenzen wurde berechnet (Gleichung 4). Der Distanzkoeffizient D ist ein Maß für die Unterschiede zweier Amino- bzw. Nukleotidsequenzen. Die S-Werte der *mxoF*-, *mch*- und *fae*- Nukleotid- und Aminosäuresequenzpaare wurden gegen die S-Werte der entsprechenden 16S rRNA Gensequenzpaare aufgetragen.

**Gleichung 4:** Ähnlichkeitskoeffizient S.

$$S = 1 - D$$

D, Distanzmaß eines Sequenzpaares.

**Tab. 35:** Sequenzen für die Berechnung eines Cut-Off-Wertes für *mxoF*-Teilsequenzen zur Differenzierung von OTUs auf Speziesebene. In die Berechnung gingen die Primer-flankierten Basen 782 bis 1290 bzw. die Aminosäuren 261 bis 430 (bezogen auf der *mxoF*-Sequenz von *Methylobacterium extorquens* AM1) ein.

Stamm	„Accession“-Nummer der <i>mxoF</i> -Sequenz	„Accession“-Nummer des 16S rRNA Gens
<i>Afipia felis</i> 25E-1	AY848826.1	AF514773.1
<i>Ancylobacter dichloromethanicum</i> DM16	EU589387.1	EU589386.1
<i>Beijerinckia mobilis</i> DSM 2326	AJ563936.2	NR_042180.1
<i>Enterobacter arachidis</i> Ah-143	EU912491.1	EU672801.1
<i>Hansschlegelia plantiphila</i> S1	DQ652143.1	DQ404188.1
<i>Hyphomicrobium facile</i> IFAM B-522	Y08068.1	Y14312.1
<i>Hyphomicrobium</i> sp. CM2	U70526.1	NR_025048.1
<i>Methylobacterium aquaticum</i> DSM 16371	EF562464.1	AB252197.1
<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	CP001510.1	CP001510.1
<i>Methylobacterium extorquens</i> DM4	FP103042.2	gFP103042.2
<i>Methylobacterium goesingense</i> iEII3	FJ157955.1	AY364020.2
<i>Methylobacterium hispanicum</i> DSM 16372	EF562468.1	AB252198.1
<i>Methylobacterium isbiliense</i> DSM17168	EU194912.1	AB302929.1
<i>Methylobacterium lusitanum</i> MP2	EF030548.1	EF015479.1
<i>Methylobacterium marchantiae</i> JT1	FJ157956.1	FJ157976.2
<i>Methylobacterium mesophilicum</i> DSM 1708	EF562470.1	NR_041026.1
<i>Methylobacterium nodulans</i> ORS 2060	EU912499.1	CP001349.1
<i>Methylobacterium phyllosphaerae</i> CBMB27	EF562496.1	NR_044105.1
<i>Methylobacterium podarium</i> FM4	AY468366.1	NR_041919.1
<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831	EF562472.1	NR_036824.1
<i>Methylobacterium rhodesianum</i> DSM 5687	EF562473.1	AB175643.1
<i>Methylobacterium rhodinum</i> DSM 2163	EF562487.1	NR_041029.1
<i>Methylobacterium salsuginis</i> MR	EF030550.1	NR_044038.1
<i>Methylobacterium</i> sp. MP3	EF030549.1	EF015480.1
<i>Methylobacterium thiocyanatum</i> DSM 11490	EF562475.1	AB175646.1
<i>Methylobacterium variabile</i> DSM16961	EU194913.1	AB302931.1
<i>Methylobacterium zatmanii</i> DSM 5688	EF031553.1	NR_041031.1
<i>Methylocapsa acidiphila</i> B2	AJ278730.1	NR_028923.1
<i>Methylocapsa aurea</i> KYGT	FN433471.1	FN433469.1
<i>Methylocella palustris</i> K/H4	AJ278731.1	AJ563927.1
<i>Methylocella silvestris</i> BL2	AJ491849.1	CP001280.1
<i>Methylocella tundrae</i> T4	AJ555246.1	NR_025596.1
<i>Methylococcus capsulatus</i> str. Bath	AE017282.2	AE017282.2
<i>Methylocystis heyeri</i> HT2	AM283544.1	NR_042531.1
<i>Methylocystis hirsuta</i> CSC1	DQ664499.1	NR_043754.1
<i>Methylocystis parvus</i> OBBP	U70515.1	NR_044946.1
<i>Methyloferula stellata</i> AR4	FR686349.1	FR686343.1
<i>Methylohalomonas lacus</i> HMT 1	EF152336.1	NR_043973.1
<i>Methylomicrobium album</i> BG8	U70513.1	NR_029244.1
<i>Methylophaga lonarensis</i> MPL	JF795948.1	JF330773.1
<i>Methylophaga thiooxydans</i> DMS010	EU001860.1	DQ660915.1
<i>Methylophilus glucoseoxidans</i> B	HM001270.1	HM001269.1
<i>Methylophilus methylotrophus</i> CBMB147	EU194905.1	EU194892.1
<i>Methylophilus rhizosphaerae</i> CBMB127	EU194904.1	EU194887.1
<i>Methylosinus sporium</i> 44/2	AJ459071.1	AJ458468.1
<i>Methylosinus sporium</i> F10/1b	AJ459088.1	AJ458489.1
<i>Methylosinus sporium</i> SE2	AJ459064.1	AJ458478.1
<i>Methylosinus sporium</i> SK13	AJ459072.1	AJ458488.1
<i>Methylosinus trichosporium</i> BF1	AJ868414.1	AJ868424.1

## Fortsetzung Tab. 35.

Stamm	„Accession“-Nummer der <i>mxhF</i> -Sequenz	„Accession“-Nummer des 16S rRNA Gens
<i>Methylosinus trichosporium</i> IMET 10561	AJ459058.1	AJ458474.1
<i>Methylosinus trichosporium</i> KS21	AJ459100.1	AJ431385.2
<i>Methylosinus trichosporium</i> M23	AJ459096.1	AJ458492.1
<i>Methylosinus trichosporium</i> O19/1	AJ459091.1	AJ458491.1
<i>Methylosinus trichosporium</i> SM6 (IMV B-3060)	AJ459061.1	AJ458477.1
<i>Methylosulfonomonas methylovora</i> M2	U70525.1	U62893.1
<i>Methylovorus menthalis</i> MM	HQ380797.1	HQ380796.1
<i>Methylovulum miyakonense</i> DSM 23269	AB501290.1	AB501287.1
<i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	HE616899.1	HE616890.1
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306	AE008923.1	AE008923.1
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> ATCC 3391	AE008922.1	AE008922.1

**Tab. 36:** Sequenzen für die Berechnung eines Cut-Off-Wertes für *mch*-Teilsequenzen zur Differenzierung von OTUs auf Speziesebene. In die Berechnung gingen die Primer-flankierten Basen 307 bis 699 bzw. die Aminosäuren 103 bis 233 (bezogen auf die *mch*-Sequenz von *Methylobacterium extorquens* AM1) ein.

Stamm	„Accession“-Nummer der <i>mch</i> -Sequenz	„Accession“-Nummer des 16S rRNA Gens
<i>Methylobacterium chloromethanicum</i> CM4	CP001298.1	CP001298.1
<i>Methylobacterium extorquens</i> PA1	CP000908.1	CP000908.1
<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	CP001510.1	CP001510.1
<i>Methylobacterium extorquens</i> DM4	FP103042.2	FP103042.2
<i>Methylobacterium populi</i> BJ001	CP001029.1	CP001029.1
<i>Methylocystis</i> sp. LW5	AY525385.1	AF150790.1
<i>Methylophilus methylotrophus</i> AS1	AF142652.1	M29021.1
<i>Methylosinus</i> sp. PW1	AY525381.1	AF150802.1

**Tab. 37:** Sequenzen für die Berechnung eines Cut-Off-Wertes für *fae*-Teilsequenzen zur Differenzierung von OTUs auf Speziesebene. In die Berechnung gingen die Primer-flankierten Basen 62 bis 398 bzw. die Aminosäuren 21 bis 133 (bezogen auf die *fae*-Sequenz von *Methylobacterium nodulans* ORS 2060) ein.

Stamm	„Accession“-Nummer der <i>fae</i> -Sequenz	„Accession“-Nummer des 16S rRNA Gens
<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1001	CP002520.1	CP002520.1
<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1002	CP002014.1	CP002014.1
<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1003	CP002218.1	CP002218.1
<i>Hyphomicrobium</i> sp. MC1	FQ859181.1	FQ859181.1
<i>Methylobacterium nodulans</i> ORS 2060	CP001349.1	CP001349.1
<i>Methylobacterium populi</i> BJ001	CP001029.1	CP001029.1
<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831	CP001001.1	CP001002.1
<i>Methylobacterium</i> sp. 4-46	CP000943.1	CP000943.1
<i>Methylocapsa acidiphila</i> B2	AY530033.1	NR_028923.1
<i>Methylomonas</i> sp. LW15	AY530029.1	AF150794.1
<i>Methylosinus</i> sp. LW4	AY530028.1	AY007293.1

### 2.8.9.3.2 Berechnung eines Datensatz-basierten Cut-Off-Wertes zur Differenzierung von OTUs

Die *mx**aF*-, *mch*- und *fae*-Sequenzen, die mit Hilfe der Pyrosequenzierung (2.8.9.1) erhalten wurden, wurden mit den Programmen Qiime (*mx**aF*) und JAguc (*mch*, *fae*) bei verschiedenen Cut-Off-Werten (100, 98, 95, 92, 90, 88, 85, 82, 80 usw.) für Sequenzähnlichkeit in OTUs differenziert. Die Anzahl der erhaltenen OTUs wurde gegen die entsprechenden Cut-Off-Werte aufgetragen. Derjenige Cut-Off-Wert, bei dem sich die Anzahl der OTUs nicht mehr wesentlich veränderte (Plateau der Kurve in Abb. 15), wurde als Datensatz-basierter Grenzwert zur Differenzierung der OTUs gewählt.

## 2.9 Erstellen von Stammbäumen

Die Erstellung von Stammbäumen erfolgte in MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011) mit Hilfe des Distanz-basierten Neighbor-Joining-Algorithmus (Saitou und Nei, 1987) und des 1000-fachen Replikationsmittels-Verfahrens (Felsenstein, 1985). Basis für die Berechnung phylogentischer Distanzen waren *in silico* translatierte Aminosäuresequenzen.

## 2.10 Deskriptive Statistik

Die deskriptive Statistik hat das Ziel, Daten zusammenzufassen und übersichtlich darzustellen. In dieser Arbeit wurden die gemittelten Oxidationsraten zusammen mit der Standardabweichung (3.2.1) und die Mittelwerte der Zellzahlen (3.3.1) berechnet. Für den Datensatz, der mittels Pyrosequenzierung erhalten wurde, wurde der Stichprobenumfang ermittelt und die Anzahl der OTUs geschätzt (3.3.3).

### 2.10.1 Mittelwert und Standardabweichung

Als wichtige Kennwerte wurden der arithmetische Mittelwert  $\bar{X}$  (Gleichung 5) und die Standardabweichung  $s$  (Gleichung 6) berechnet. Die Standardabweichung berechnet sich dabei aus der Varianz  $s^2$  (Gleichung 7) (Bärlocher, 2008).

**Gleichung 5:** Arithmetischer Mittelwert  $\bar{X}$ .

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \times \sum x_i$$

$n$ , Anzahl der Werte;  $x_i$ , Wert.

**Gleichung 6:** Standardabweichung  $s$ .

$$s = \sqrt{s^2}$$

**Gleichung 7:** Varianz  $s^2$ .

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum (x_i - \bar{X})^2$$

$n$ , Anzahl der Werte;  $x_i$ , Wert.

### 2.10.2 Abschätzung des Stichprobenumfangs

Um zu überprüfen, ob die Anzahl der Stichproben des Pyrosequenzierungsdatensatzes ausreichend war, wurde die Coverage (Abdeckung)  $C$  (Gleichung 8) berechnet (Schloss *et al.*, 2004).

**Gleichung 8:** Coverage  $C$ .

$$C = 1 - \frac{n}{N} \times 100$$

$n$ , Anzahl der OTUs mit einer einzigen Sequenz;  $N$ , Stichprobenzahl bzw. Anzahl der Sequenzen in einem Objekt.

### 2.10.3 Abschätzung der Anzahl der OTUs

Die geschätzte Anzahl an verschiedenen OTUs wurde durch einen nicht-parametrischen Koeffizient, dem Chao 1 Schätzwert (Gleichung 9), dargestellt (Chao, 1984; Colwell und Coddington, 1994).

**Gleichung 9:** Chao 1.

$$\text{Chao 1} = \text{OTU}_{\text{obs}} + \frac{a^2}{2b}$$

$\text{OTU}_{\text{obs}}$ , Anzahl der beobachteten OTUs;  $a$ , Anzahl der OTUs, die einmal vorkommen;  $b$ , Anzahl der OTUs, die zweimal vorkommen.

### 2.10.4 Artendiversität

Unter  $\alpha$ -Diversität oder Artendiversität versteht man die Anzahl der Arten in einem Untersuchungsgebiet oder innerhalb einer definierten Gemeinschaft (Trempe, 2005). Da in dieser Studie keine Arten, sondern OTUs oder auch Genotypen detektiert wurden, ist im Folgenden der Begriff Art mit OTU gleichzusetzen. Die Artendiversität verschiedener Objekte wurde durch die Berechnung von Diversitätsindizes numerisch vergleichbar gemacht. Der Shannon-Index  $H'$  (Gleichung 10) vereinigt Artenzahl und Evenness (Ausgeglichenheit) zwischen den Mengenanteilen der Arten (Magurran, 1988). Die Diversität ist am höchsten, wenn die Arten untereinander dieselbe Populationsdichte aufweisen. Um die Evenness  $J'$  zu berechnen, müssen  $H'$  und das mögliche Maximum von  $H'$  ( $H'_{\max}$ ) zueinander ins Verhältnis gesetzt werden (Gleichung 11) (Magurran, 1988).

**Gleichung 10:** Shannon-Index  $H'$ .

$$H' = - \sum_{i=1}^S \frac{S_i}{N} \ln \frac{S_i}{N}$$

$S$ , Anzahl der OTUs;  $S_i$ , Anzahl der Sequenzen pro OTU;  $N$ , Stichprobenzahl bzw. Anzahl der Sequenzen in einem Objekt.

**Gleichung 11:** Evenness-Index  $J'$ .

$$J' = \frac{H'}{H'_{\max}} = \frac{H'}{\ln S}$$

$H'$ , Shannon-Index;  $S$ , Anzahl der OTUs.

## 2.11 Explorative Statistik

Durch Methoden der explorativen Statistik wurden Zusammenhänge zwischen den Datensätzen der MPN-Analyse bzw. der Amplikon-Pyrosequenzierung und den Umweltparametern durch Hypothesenbildung und Signifikanztests analysiert. Statistische Analysen, bei der nur eine abhängige Variable betrachtet wird, bezeichnet man als univariat. Gehen mehrere abhängige Variablen in die Analyse ein, spricht man von einer multivariaten Methode (Leyer und Wesche, 2007). Arteigenschaften wie die prozentuale Häufigkeit eines OTUs sind abhängige Variablen. Unabhängige oder erklärende Variablen sind Umweltvariablen wie z.B. der pH-Wert. Weitere wichtige statistische Grundbegriffe sind Art und Aufnahme. Der Begriff Art beschreibt ganz allgemein die abhängige Variable und stellt nicht zwangsläufig eine taxonomische Einheit dar. Die untersuchten Objekte wie z.B. die

Bodenprobe HEG 6 werden als Aufnahmen bezeichnet (Leyer und Wesche, 2007). Das Formulieren einer Nullhypothese ist ein wichtiger Bestandteil von statistischen Analysen. Mit Hilfe eines Signifikanztests wird die Nullhypothese überprüft (Trempe, 2005).

### 2.11.1 Prozentuale Häufigkeiten

Die prozentuale Häufigkeit (A) jedes OTUs und der Zellzahlen wurde mit Hilfe der Gleichung 12 berechnet (Noll *et al.*, 2005). Alle statistischen Analysen wurden mit den Werten der prozentualen Häufigkeiten der OTUs und Zellzahlen durchgeführt.

**Gleichung 12:** Prozentuale Häufigkeit A.

$$A = \frac{n_i \times 100}{N}$$

$n_i$ , Anzahl der Sequenzen in dem OTU  $i$  pro Boden bzw. Zellzahl je Medium  $i$ ;  $N$ , Anzahl der Sequenzen pro Boden bzw. Gesamt-Zellzahl in allen acht Medien pro Boden.

### 2.11.2 Systematisierung der Daten und Normalverteilungstest

Basis für die Auswahl eines statistischen Verfahrens ist die Systematisierung der Daten. Die Zahlenwerte können einer Skala z.B. der Nominalskala oder der metrischen Skala zugeordnet werden. Nominale Daten wie Vegetationstyp und Landnutzungsintensität sind rein qualitativ (Trempe, 2005). Metrische Daten wie pH-Wert, gravimetrischer Wassergehalt, Nitrat-, Ammonium-, Gesamtkohlenstoff- und Gesamtstickstoffgehalt sind hingegen quantitativ (Trempe, 2005). Auch die Häufigkeitsverteilung der Daten ist ein wichtiges Kriterium für die Auswahl eines statistischen Verfahrens. Um die Häufigkeitsverteilung zu überprüfen, wurden die prozentualen Häufigkeiten mit Hilfe der Software OriginPro 8G SR4 einem Normalverteilungstest nach Shapiro-Wilk (Royston, 1995) unterzogen. Die Nullhypothese lautete, dass die Daten normalverteilt sind. Mit Hilfe der Teststatistik wurde die Wahrscheinlichkeit (W) für eine Normalverteilung der Daten berechnet. Die Nullhypothese wurde abgelehnt, sobald W kleiner war als der kritische P-Wert von 0,05.

### 2.11.3 Univariate Statistik

Ziel der statistischen Analyse mit univariaten Methoden war es herauszufinden, ob Umweltparameter voneinander abhängen und ob die mittleren oder höchsten Zellzahlen mit den Umweltparametern korrelieren. Des Weiteren sollten OTUs identifiziert werden, die indikativ für den Landnutzungstyp oder die Landnutzungsintensität sind. Da eine

Normalverteilung der Daten nicht vorlag, wurden verteilungsfreie bzw. nicht-parametrische Analysemethoden angewandt.

### 2.11.3.1 Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten $r_s$ nach Spearman

Der Begriff Korrelation beschreibt die Stärke eines Zusammenhangs zweier Variablen. Anders als bei einer Regressionsanalyse ist nicht klar, welche der beiden Variablen die abhängige und welche die unabhängige Variable ist (Leyer und Wesche, 2007). Es wurde getestet, ob Umweltparameter miteinander oder mit den höchsten oder den gemittelten Zellzahlen korrelierten. Dazu wurde der Rangkorrelationskoeffizient  $r_s$  nach Spearman mit Hilfe der Software XLSTAT (Version 2012.4.03) berechnet. Der Wert  $r_s$  (Gleichung 13) variiert zwischen -1 und +1. Der Wert +1 bedeutet eine perfekte positive Korrelation. Der Wert -1 bedeutet eine perfekte negative Korrelation. Die Null-Hypothese lautete, dass keine Korrelation der Werte vorliegt. Die Ausgangsdaten müssen mindestens metrisch skaliert sein, da sie durch den Permutationstest in Ränge überführt werden. Landnutzungsintensität und Vegetationstyp sind nominal skaliert und können daher nicht mit Hilfe eines Korrelationstests nach Spearman getestet werden (Bärlocher, 2008). Im Gegensatz zu anderen Korrelationskoeffizienten wie z.B. dem Rangkorrelationskoeffizient nach Pearson, ist eine Normalverteilung der Daten nicht nötig.

**Gleichung 13:** Rangkorrelationskoeffizient  $r_s$  nach Spearman.

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum D^2}{n \times (n^2 - 1)}$$

D, Rangdifferenz; n, Anzahl der Wertepaare.

### 2.11.3.2 U-Test (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test)

Es wurde untersucht, ob ein signifikanter Zusammenhang der nominal skalierten Merkmalsausprägungen Vegetationstyp und Landnutzungsintensität mit den metrischen Umweltparametern (pH, Nitratkonzentration, Ammoniumkonzentration, Gesamtkohlenstoffgehalt, Gesamtstickstoffgehalt, gravimetrischer Wassergehalt) oder den gemittelten und höchsten Zellzahlen besteht. Dazu wurde der U-Test mit der Software XLSTAT (Version 2012.4.03) durchgeführt. Allgemein können mit diesem Test zwei unverbundene Stichproben verglichen werden. Eine Normalverteilung der Daten wird nicht vorausgesetzt (Bärlocher, 2008). Die Nullhypothese lautete, dass die Differenz der metrischen Umweltvariablen bei unterschiedlichen Vegetationstypen und Landnutzungsintensitäten gleich null war. War der P-Wert größer als das Signifikanzniveau von 0,05, wurde die Nullhypothese bestätigt.



### 2.11.3.3 Identifizierung von Indikatorarten

Im Pyrosequenzierungsdatensatz wurden Indikatorarten bzw. Indikator-OTUs identifiziert, die bestimmte Umweltbedingungen aufzeigten. Indikatorarten zeichnen sich dadurch aus, dass sie in einer Gruppe einer bestimmten Merkmalsausprägung häufig vorkommen, während sie in den anderen Gruppen möglichst nicht häufig sind. Es wurden für signifikant beeinflussende nominale Variablen wie z.B. den Vegetationstyp, Indikatorwerte (IV-Werte) (Gleichung 14, Gleichung 15, Gleichung 16) mit dem Programm PC-ORD (Version 4.01) berechnet (Dufrêne und Legendre, 1997).

**Gleichung 14:** Indikatorwert  $IV_{kj}$ .

$$IV_{kj} = 100 \times RA_{kj} \times RF_{kj}$$

$RA_{kj}$ , relative Abundanz der Art  $j$  in der Gruppe  $k$  im Verhältnis zur Abundanz im ganzen Datensatz (Gleichung 15);  $RF_{kj}$ , relative Frequenz (Gleichung 16).

**Gleichung 15:** Relative Abundanz  $RA_{kj}$  der Art  $j$  in der Gruppe  $k$  im Verhältnis zur Abundanz im ganzen Datensatz.

$$RA_{kj} = \frac{NAbundanz_{kj}}{NAbundanz_{+k}}$$

$NAbundanz_{kj}$ , Mittlere Abundanz der Art  $j$  in der Gruppe  $k$ ;  $NAbundanz_{+k}$ , Summe der mittleren Abundanzen über alle Gruppen.

**Gleichung 16:** Relative Frequenz  $RF_{kj}$ .

$$RF_{kj} = \frac{NObjekte_{kj}}{NObjekte_{k+}}$$

$NObjekte_{kj}$ , Anzahl der Objekte, die die Art  $j$  enthalten;  $NObjekte_{k+}$ , Gesamtzahl der Objekte in der Gruppe  $k$ .

IV-Werte können von 0% bis 100% reichen. 0% bedeutet keine Indikation, 100% bedeutet maximale Indikation. Ob die Verteilung zufällig ist, wurde mit Hilfe des Monte Carlo Tests mit 1000 Permutationen überprüft. Die Nullhypothese lautete, dass es sich bei dem jeweiligen OTU nicht um einen Indikator handelt.

## 2.11.4 Multivariate Statistik

Es wurde davon ausgegangen, dass eine Variation in der OTU-Zusammensetzung bzw. eine Variation der Zellzahlen auf einer Veränderung von Standortfaktoren beruht. Die in dieser Arbeit generierten OTU-Plot-Matrizen und Zellzahl-Plot-Matrizen zusammen mit den erhobenen Umweltdaten stellen einen multivariaten Datensatz dar und können auch als Art-Aufnahme-Matrizen bezeichnet werden. Eine Reduktion der Dimensionen ist nötig, um interpretierbare Diagramme von multivariaten Datensätzen zu erhalten. Ordinationstechniken wie die Korrespondenzanalyse („Correspondence Analysis“, CA) oder die Hauptkomponentenanalyse („Principal Component Analysis“, PCA) arbeiten wichtige ökologische Gradienten heraus, entlang derer die Aufnahmen und Arten angeordnet werden können. Ziel dabei ist es, Achsen zu definieren, die eine möglichst große Varianz des Datensatzes erklären. Die CA basiert auf der Annahme, dass sich Arten entlang eines Gradienten unimodal verhalten, während die PCA eine lineare Art-Standort-Faktor-Beziehung vorausgesetzt. In der Ökologie ist die CA die am häufigsten angewandte Ordinationsmethode, denn die meisten Artreaktionen haben ein bestimmtes Optimum entlang eines Gradienten (Leyer und Wesche, 2007).

### 2.11.4.1 Detrended Korrespondenzanalyse (DCA)

Basis für eine CA ist eine unimodale Art-Standortfaktor-Beziehung. Um ein Maß für die Güte der unimodalen Verteilung zu erhalten wurde eine „detrended“ (entzerrte) Korrespondenzanalyse (DCA) durchgeführt. Die prozentualen Häufigkeiten wurden logarithmiert, um zu verhindern, dass einige wenige hohe Werte die Ordination übermäßig stark beeinflussen (Leyer und Wesche, 2007; ter Braak und Šmilauer, 2002). Die DCA ist eine Ordinationsmethode, die rein auf den Artwerten basiert. Sie ist unabhängig von Umweltfaktoren. Es handelt es sich um eine Methode zur indirekten Gradientenanalyse und um eine Weiterentwicklung der CA. Als ein mathematisches Artefakt der CA kann es zu einer Bogenform der Aufnahmewerte kommen. Dies wird auch als „Arch-Effekt“ (Bogeneffekt) bezeichnet. Der zweiten Achse des Ordinationsdiagramms wird dabei eine höhere Bedeutung zugemessen als ihr zusteht. Durch das „detrending by segments“ im Zuge der DCA werden die Aufnahmewerte der zweiten Achse entlang der ersten Achse zentriert und die erste Achse anschließend standardisiert. Der „Arch-Effekt“ wird so mathematisch korrigiert. Die Einheit der Achsen der DCA wird in „Standard Deviation“ (Standardabweichungen, SD) angegeben. An den Ordinationsachsen der DCA kann abgelesen werden, wie sehr sich die Aufnahmewerte zweier Aufnahmen unterscheiden. Die am weitesten voneinander entfernt liegenden Aufnahmewerte haben einen bestimmten Abstand auf der ersten Ordinationsachse. Dieser Abstand wird als Gradientenlänge bezeichnet. Die Gradientenlänge ist ein Maß für die unimodale Verteilung der Arten entlang von Umweltparametern. Eine Gradientenlänge von mehr als 4 SD wird als lang bezeichnet. Sie ist ein Hinweis auf eine unimodale Verteilung. Eine Gradientenlänge kleiner 3 SD wird

als kurz bezeichnet und beschreibt eine eher lineare Verteilungskurve (Leyer und Wesche, 2007; ter Braak und Šmilauer, 2002).

#### **2.11.4.2 Kanonische Korrespondenzanalyse (CCA) und Monte Carlo Test**

Bei der Kanonischen Korrespondenzanalyse („Canonical Correspondence Analysis“, CCA) handelt es sich um eine direkte Ordinationstechnik. Die Achsen stellen lineare Kombinationen der Umweltfaktoren dar. Aus Artwerten werden Aufnahmewerte berechnet. Um diejenigen Umweltvariablen zu bestimmen, die mit der OTU-Verteilung funktioneller Gene oder den Zellzahlen in verschiedenen Medien signifikant korrelierten, wurde eine CCA und ein Monte Carlo Test mit 9999 Permutationen durchgeführt.

Folgende Umweltvariablen wurden einzeln getestet: Vegetationstyp, Landnutzungsintensität, pH-Wert, gravimetrischer Wassergehalt, Nitratkonzentration, Ammoniumkonzentration, Gesamtkohlenstoff- und Gesamtstickstoffgehalt. Die Referenzverteilung für den Monte Carlo Test wird aus den Daten selbst bestimmt. Daher ist für eine Monte Carlo Test keine Normalverteilung der Daten nötig (Leyer und Wesche, 2007). Die relativen Häufigkeiten der OTUs bzw. der Zellzahlen wurden wie bei der DCA logarithmisch transformiert. Die Nullhypothese lautete, dass die relativen Häufigkeiten nicht mit den Umweltdaten korrelieren. Ob die wichtigsten Umweltvariablen in der Analyse betrachtet wurden, lässt sich durch den sogenannten Trace-Wert abschätzen. Dieser entspricht der Summe der Eigenwerte  $\lambda$  aller Ordinationsachsen und ist ein Maß für die Variation, die durch alle Ordinationsachsen dargestellt wird. Die Eigenwerte können zwischen 0 und 1 liegen. Ein Eigenwert der ersten Ordinationsachse von 0,5 repräsentiert eine gute Auftrennung der Arten entlang dieser Achse (Leyer und Wesche, 2007).

#### **2.11.4.3 Erstellung der Ordinationsdiagramme**

Nachdem diejenigen Faktoren identifiziert worden waren, die die OTU-Zusammensetzung bzw. die Zellzahlen in verschiedenen Medien signifikant beeinflussten, wurden mit Hilfe der Software CanoDraw verschiedene Ordinationsdiagramme erstellt. Allgemein gilt, dass in Ordinationsdiagrammen mit Arten und Aufnahmen entweder die Artpunkte oder die Aufnahmepunkte optimal dargestellt werden können (Leyer und Wesche, 2007; ter Braak und Šmilauer, 2002). Der Skalierungstyp wurde anhand der Gradientenlänge ausgewählt. Die Biplot-Skalierung wurde bei einem eher kurzen Gradienten angewandt (Leyer und Wesche, 2007; ter Braak und Šmilauer, 2002). Der Fokus lag auf der Artenbeziehung. Bei eher langen Gradienten wurde die Hill-Skalierung mit Fokus auf die Aufnahmebeziehungen angewandt. In Ordinationsdiagrammen mit Umweltvariablen werden nominale Umweltvariablen als Zentroide, metrische Umweltvariablen als Vektorpfeile dargestellt. Je länger der Vektor relativ zu einer bestimmten Ordinationsachse ist, desto mehr trägt die Umweltvariable zu der jeweiligen Ordinationsachse bei. Die Vektorspitze zeigt in die

Richtung der ansteigenden Werte der Umweltvariablen. Die Interpretation der Diagramme mit Arten und Umweltparameter erfolgte nach der Biplot-Regel. Es wurde ein Lot von der Art auf den Pfeil der Umweltvariablen gefällt. So konnte eine Reihenfolge der projizierten Artpunkte erhalten werden. Die Reihenfolge der Lote repräsentierte die Reihenfolge der relativen Werte für die Umweltvariable.

#### **2.11.4.4 Überprüfung der CCA**

Ein Vergleich der relativen Positionen der Aufnahmepunkte der DCA- und der CCA-Ordinationsdiagramme und der jeweiligen Eigenwerte lieferte Informationen zur Qualität der CCA. Waren die relativen Positionen der Aufnahmepunkte und die Eigenwerte der CCAs und der DCAs ähnlich, wurde die Schlussfolgerung gemacht, dass nahezu alle Umweltvariablen in der CCA betrachtet wurden, die mit den relativen Häufigkeiten korrelierten (Leyer und Wesche, 2007; ter Braak und Smilauer, 2002). Unterschieden sich die relativen Positionen der Aufnahmepunkte und die Eigenwerte zwischen der DCA und der CCA, war das ein Hinweis darauf, dass Umweltparameter existieren, die in dieser Studie nicht erfasst wurden, aber signifikant mit den relativen Häufigkeiten korrelieren.

## 2.12 Zu dieser Arbeit beitragende Ergebnisse

Einige Arbeitsschritte, die in dieser Dissertation dargestellt sind, wurden im Rahmen von Bachelorarbeiten oder durch Kooperationspartner durchgeführt (Tab. 38).

**Tab. 38:** Beiträge zu dieser Doktorarbeit.

Arbeitsschritt	Bachelorarbeit	Kooperationspartner	Ergebnisse, zu denen beigetragen wurde
Bestimmung des Trockengewichtes (2.3)	Glowik, 2008; Zaatreh, 2008	-	3.1; 3.3.1; 3.3.5; 3.3.7; 3.3.9
Bestimmung des gravimetrischen Wassergehaltes (2.3)	Glowik, 2008; Zaatreh, 2008	-	3.1; 3.3.1; 3.3.5; 3.3.7; 3.3.9
Bestimmung der Nitratkonzentration (2.3)	-	Mirjam Selzer (Institut für Ökologische Mikrobiologie, Bayreuth)	3.1; 3.3.1; 3.3.5; 3.3.7; 3.3.9
Bestimmung des pH-Wertes (2.3)	-	Mirjam Selzer (Institut für Ökologische Mikrobiologie, Bayreuth)	3.1; 3.3.1; 3.3.5; 3.3.7; 3.3.9
Bestimmung der Ammoniumkonzentration (2.3)	-	Dr. Ingo Schöning (Max-Planck-Institut für Biochemie, Jena)	3.1; 3.3.1; 3.3.5; 3.3.7; 3.3.9
Bestimmung des Gesamtkohlenstoffgehaltes (2.3)	-	Dr. Ingo Schöning (Max-Planck-Institut für Biochemie, Jena)	3.1; 3.3.1; 3.3.5; 3.3.7; 3.3.9
Bestimmung des Gesamtstickstoffgehaltes (2.3)	-	Dr. Ingo Schöning (Max-Planck-Institut für Biochemie, Jena)	3.1; 3.3.1; 3.3.5; 3.3.7; 3.3.9
Herstellung erster Anreicherungen und Gewinnung von Reinkulturen (2.7.2)	Ebertsch 2009; Glowik 2008	-	3.3.10; Tab. A
Bestimmung der Zellzahlen (2.7.3)	Ebertsch 2009; Glowik 2008	-	3.3.1
Nukleinsäure-Extraktion nach Griffiths (2.8.2)	Lampert, 2011	-	3.2.3
Optimierung der Amplifikation von <i>mxnF</i> (2.8.4.2)	Ebertsch, 2009; Hetz, 2010; Lampert, 2011; Thamm, 2008	-	3.3.3; 3.3.4; 3.3.5
Bereinigung der Sequenzdatensätze von <i>fae</i> und <i>mch</i> (2.8.9.2)	-	Dr. Charles K. Lee (Faculty of Science and Engineering, Waikato, NZ)	3.3.3; 3.3.6; 3.3.7; 3.3.8; 3.3.9

### 3. ERGEBISSE

#### 3.1 Bodenparameter

Von den Böden der Exploratorien Schwäbische Alb (AEG 2, AEG 7, AEW 5, AEW 8), Hainch (HEG 6, HEG 9, HEW 5, HEW 12) und Schorfheide-Chorin (SEG 2, SEG 6, SEW 5, SEW 9) wurden der pH-Wert, die Nitrat- und Ammoniumkonzentration und der Gesamtkohlenstoff- und der Gesamtstickstoffgehalt, sowie der gravimetrische Wassergehalt bestimmt (2.3). Die Grünlandböden AEG 7 und SEG 2 hatten die höchsten pH-Werte. Die Waldböden SEW 5 und SEW 9 hatten nicht nur die niedrigsten pH-Werte, sondern auch sehr niedrige Werte für Nitrat- und Ammoniumkonzentration sowie gravimetrischem Wassergehalt (Tab. 39).

**Tab. 39:** Wichtige Parameter der Böden.

Standort	Bodentyp <sup>a</sup>	pH-Wert der wässrigen Aufschlämmung <sup>b</sup>	[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] (µg/g <sub>TG</sub> ) <sup>b</sup>	[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] (µg/g <sub>TG</sub> ) <sup>g</sup>	[C] (g/kg <sub>TG</sub> ) <sup>g</sup>	[N] (g/kg <sub>TG</sub> ) <sup>g</sup>	[H <sub>2</sub> O] (%) <sup>h,i</sup>
FG	Cambisol	6,0 <sup>c</sup>	-	-	-	-	-
OG	Histosol	7,0 <sup>c</sup>	-	-	-	-	-
AEG 2	Leptosol	6,9 <sup>b,d</sup>	2,8 <sup>d</sup>	23,8	46,8	4,7	33,2
AEG 7	Leptosol	7,6 <sup>b,d</sup>	1,8 <sup>d</sup>	23,2	94,4	3,3	41,2
AEW 5	Cambisol	5,6 <sup>b,d</sup>	1,3 <sup>d</sup>	24,7	47,7	4,0	37,0
AEW 8	Cambisol	6,4 <sup>b,d</sup>	2,2 <sup>d</sup>	25,0	52,2	4,0	48,5
HEG 6	Stagnosol	6,5 <sup>b,e</sup>	0,4 <sup>f</sup>	20,2	14,6	1,7	21,3
HEG 9	Stagnosol	7,0 <sup>b,e</sup>	0,3 <sup>e</sup>	19,7	40,2	3,3	26,6
HEW 5	Luvisol	5,4 <sup>b,e</sup>	1,0 <sup>f</sup>	24,7	33,5	2,9	41,5
HEW 12	Luvisol	4,8 <sup>b,e</sup>	0,6 <sup>e</sup>	20,9	39,0	2,6	25,6
SEG 2	Histosol	7,5 <sup>b,d</sup>	1,6 <sup>d</sup>	24,9	154,0	10,7	43,8
SEG 6	Histosol	5,8 <sup>b,d</sup>	1,6 <sup>d</sup>	23,6	301,2	24,5	60,4
SEW 5	Cambisol	4,0 <sup>b,d</sup>	0,6 <sup>d</sup>	16,4	2,0	33,1	15,4
SEW 9	Cambisol	4,5 <sup>b,d</sup>	0,4 <sup>d</sup>	15,2	50,8	2,8	12,9

Abkürzungen: [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>], Nitratkonzentration; [NH<sub>4</sub><sup>+</sup>], Ammoniumkonzentration; [C], Gesamtkohlenstoffgehalt; [N], Gesamtstickstoffgehalt; [H<sub>2</sub>O], gravimetrischer Wassergehalt; g<sub>TG</sub>, Gramm Trockengewicht des Bodens; kg<sub>TG</sub>, Kilogramm Trockengewicht des Bodens.

<sup>a</sup>Fischer *et al.*, 2010

<sup>b</sup>Selzer, Lehrstuhl für Ökologische Mikrobiologie, Universität Bayreuth

<sup>c</sup>Daten für die Bodenproben vom Oktober 2010

<sup>d</sup>Mittelwerte der Daten für die Bodenproben vom April 2008, April 2009.

<sup>e</sup>Mittelwerte der Daten für die Bodenproben vom April 2008, Dezember 2008, April 2009, Mai 2009

<sup>f</sup>Mittelwerte der Daten für die Bodenproben vom April 2008, Dezember 2008, Mai 2009

<sup>g</sup>Schöning, Max-Planck-Institut für Biochemie, Jena

<sup>h</sup>Daten für die Bodenproben vom April 2008

<sup>i</sup>Glowik, 2008; Zaatreh, 2008

Der maximale Gesamtkohlenstoffgehalt wurde für den Boden SEG 6 ermittelt. Der Wert war etwa 150mal höher als der niedrigste Wert für den Kohlenstoffgehalt, gemessen für SEW 5 (Tab. 39). SEG 6 war zudem der Boden mit dem zweithöchsten Gesamtstickstoffgehalt und dem höchsten Wassergehalt (Tab. 39). SEW 9 hingegen hatte einen eher niedrigen Wert für den Gesamtstickstoffgehalt und den niedrigsten gravimetrischen Wassergehalt (Tab. 39).

Der Rangkorrelationstest nach Spearman (2.11.3.1) ergab, dass Nitratkonzentration, Ammoniumkonzentration, Gesamtkohlenstoffgehalt und gravimetrischer Wassergehalt miteinander positiv korrelierten. Dabei war die Korrelation der Nitratkonzentration mit der Ammoniumkonzentration eindeutiger als die Korrelation der Nitratkonzentration mit dem Gesamtkohlenstoffgehalt oder dem Wassergehalt (Tab. 40). Der Stickstoffgehalt korrelierte positiv mit dem Kohlenstoffgehalt und dem gravimetrischen Wassergehalt. Der pH-Wert korrelierte mit keinem der in dieser Doktorarbeit bestimmten metrischen Parameter (Tab. 40).

**Tab. 40:** Korrelation der metrischen Bodenparameter. Dargestellt sind die Rangkorrelationskoeffizienten  $r_s$  nach Spearman (2.11.3.1) für alle möglichen Parametervergleiche. Signifikante Korrelationen ( $P < 0,05$ ) sind grau hinterlegt.

Parameter	pH <sup>a</sup>	[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]	[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ]	[C]	[N]	[H <sub>2</sub> O]
pH	1	0,427	0,357	0,462	0,406	0,441
[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]	0,427	1	0,769	0,629	0,545	0,692
[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ]	0,357	0,769	1	0,650	0,434	0,825
[C]	0,462	0,629	0,650	1	0,783	0,762
[N]	0,406	0,545	0,434	0,783	1	0,657
[H <sub>2</sub> O]	0,441	0,692	0,825	0,762	0,657	1

Abkürzungen: [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>], Nitratkonzentration; [NH<sub>4</sub><sup>+</sup>], Ammoniumkonzentration; [C], Gesamtkohlenstoffgehalt; [N], Gesamtstickstoffgehalt; [H<sub>2</sub>O], gravimetrischer Wassergehalt.

<sup>a</sup>der Aufschlammung in Wasser (2.3)

Der U-Test (2.11.3.2) ergab, dass Vegetationstyp und pH-Wert signifikant korrelierten. Die Nullhypothese, die besagte, dass kein Zusammenhang zwischen Vegetationstyp und pH-Wert vorlag, wurde verworfen, da der P-Wert kleiner war als 0,05 (Tab. 41). Die Waldböden hatten einen signifikant niedrigeren pH-Wert als die Grünlandböden. Alle anderen metrischen Umweltvariablen zeigten keine signifikante Korrelation mit den nominalen Umweltvariablen. Die Nullhypothese wurde in diesen Fällen verifiziert, da die P-Werte größer waren als 0,05 (Tab. 41).

**Tab. 41:** Vergleich der Umweltparameter, die für Standorte mit unterschiedlichem Vegetationstyp und unterschiedlicher Landnutzungsintensität bestimmt wurden. Dargestellt sind die P-Werte, die durch den U-Test (2.11.3.2) ermittelt wurden. Signifikante Unterschiede ( $P < 0,05$ ) sind grau hinterlegt.

Parameter	Vegetationstyp	Landnutzungsintensität
pH	0,008	0,936
[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]	0,149	0,810
[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ]	1,000	0,471
[C]	0,230	0,936
[N]	0,378	0,173
[H <sub>2</sub> O]	0,471	0,810

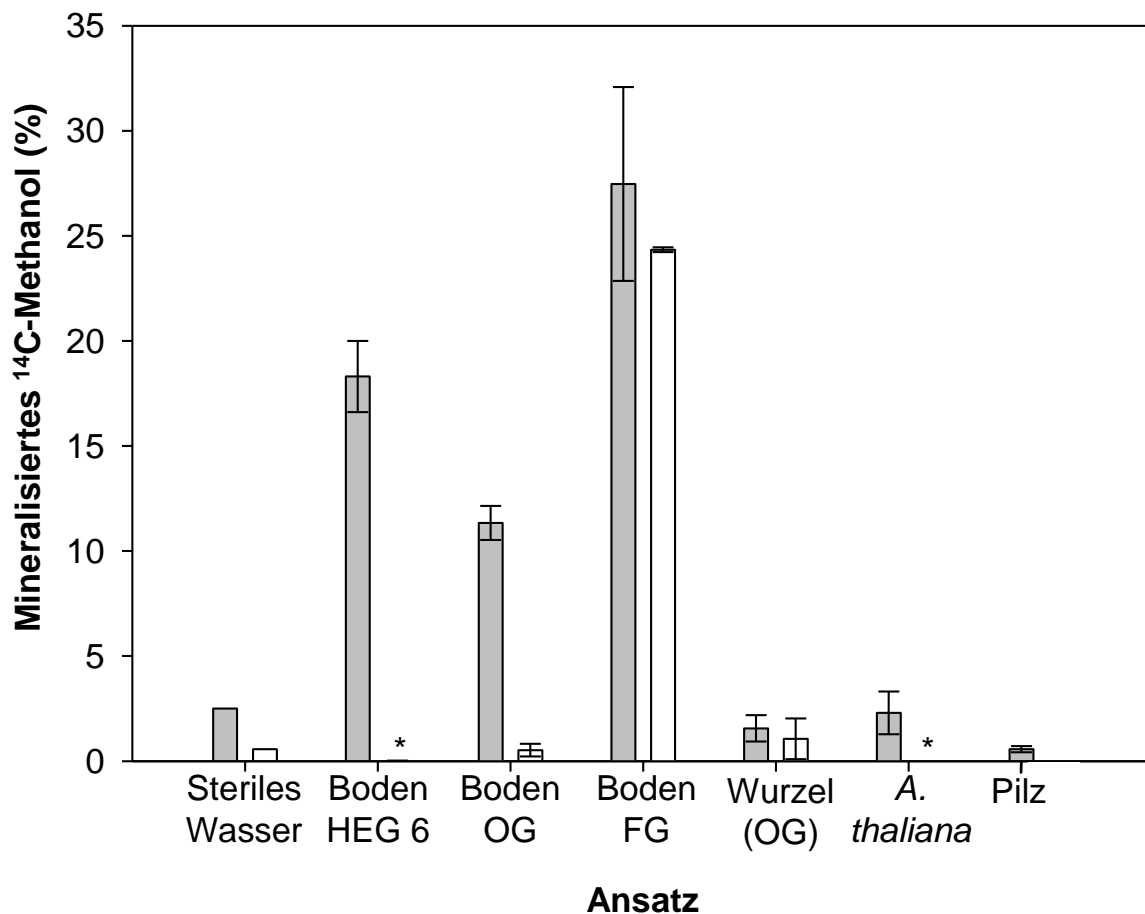
Abkürzungen: [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>], Nitratkonzentration; [NH<sub>4</sub><sup>+</sup>], Ammoniumkonzentration; [C], Gesamtkohlenstoffgehalt; [N], Gesamtstickstoffgehalt; [H<sub>2</sub>O], gravimetrischer Wassergehalt.



## 3.2 Biologischer Abbau von Methanol

### 3.2.1 Oxidation von Methanol und apparente kinetische Parameter in Bodenaufschlammungen

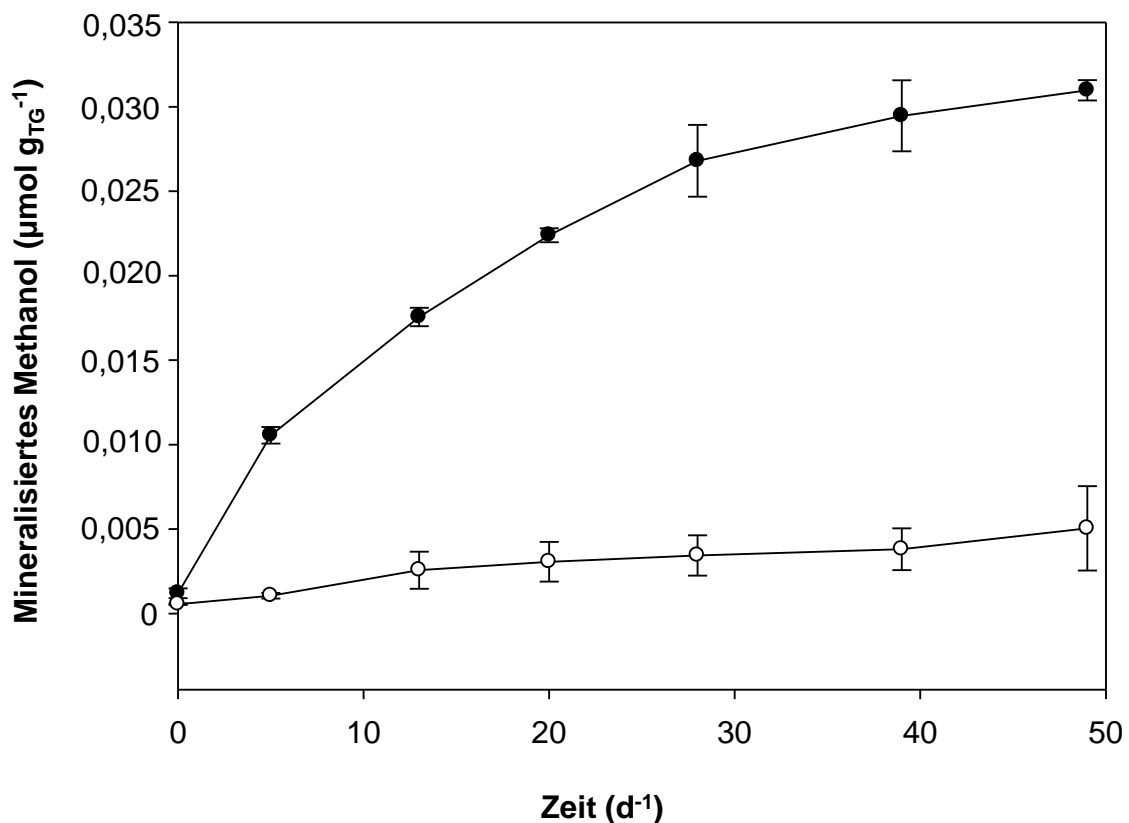
Für alle drei getesteten Grünlandböden (HEG 6, OG, FG) wurde ein Oxidationspotenzial von Methanol nachgewiesen (Abb. 7, Abb. 8, Abb. 9, Tab. 42). Nach 13 Tagen waren mindestens 10% des zur Verfügung gestellten Methanols in den Bodenaufschlammungen dissimiliert (Abb. 7).



**Abb. 7:** Mineralisiertes  $^{14}\text{C}$ -Methanol in Ansätzen mit Boden und Pflanzenmaterial nach 13 Tagen Inkubation bei Raumtemperatur. Der prozentuale Anteil des mineralisierten  $^{14}\text{C}$ -Methanols am eingesetzten  $^{14}\text{C}$ -Methanol. \*, Werte kleiner als 0,01%. Weiße Säulen, Ansätze mit Cyanid; Graue Säulen, Ansätze ohne Cyanid. Dargestellt sind gemittelte Werte aus je zwei Ansätzen zusammen mit der Standardabweichung. Die absoluten Mengen an Radioaktivität (dpm), die in den Reaktionsgefäßen der  $\text{CO}_2$ -Fälle (Abb. 4) aufgefangen wurden, sind in Tab. B im Anhang aufgelistet.

Die niedrigste getestete Methanolkonzentration in Bodenaufschlämmungen war  $0,002 \mu\text{mol Methanol g}_{\text{TG}}^{-1}$  (entspricht einer Methanolkonzentration von  $0,05 \mu\text{M}$ ) (Tab. 9). Die Oxidation von Methanol wurde auch in diesen Bodenaufschlämmungen von HEG 6 nachgewiesen. Die Oxidationsraten der einzelnen Duplikate der Bodenaufschlämmungen und Ansätze mit Pflanzenmaterial waren zueinander ähnlich (Abb. 7). Die Bodenaufschlämmungen zeigten ein höheres Potenzial Methanol zu oxidieren als unter sterilen Bedingungen gezüchtete *Arabidopsis thaliana* oder gewaschene Wurzeln des Bodens OG (Abb. 7). Pilzkulturen, die nach Inokulation von Saline mit Überstand der Ansätze von *A. thaliana* erhalten wurden (2.6.2), zeigten eine deutliche Trübung. Das Oxidationspotenzial dieser Kulturen war geringer als das der Ansätze mit *A. thaliana* (Abb. 7).

Fast alle Ansätze, die Kaliumcyanid enthielten, zeigten ein geringeres Oxidationspotenzial als die entsprechenden Ansätze ohne Kaliumcyanid. Lediglich die Aufschlämmungen von FG mit Kaliumcyanid und ohne Kaliumcyanid unterschieden sich hinsichtlich ihres Oxidationspotenzials kaum (Abb. 7). Die Mineralisierung von Methanol in Ansätzen mit sterilem Wasser ohne Inokulum war immer niedriger als in den Ansätzen mit Boden (Abb. 7, Abb. 8). Es wurden keine Lag-Phasen beobachtet (Abb. 8).



**Abb. 8:** Mineralisierung von Methanol in Ansätzen mit Boden OG und sterilem Wasser. Die Anfangskonzentration von Methanol in der Bodenaufschlämmung war  $0,07 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$  (entspricht  $10 \mu\text{M}$ ). Dargestellt sind gemittelte Werte aus je zwei Ansätzen zusammen mit der Standardabweichung. Schwarz, Boden; Weiß, Wasser.

Die Dissimilationsraten in Bodenaufschlammungen von OG, FG und HEG 6 mit einer Anfangskonzentration von  $0,07 \mu\text{mol Methanol g}_{\text{TG}}^{-1}$  (entspricht  $10 \mu\text{M}$ ) waren verschieden. In Aufschlammungen von FG wurde bei dieser Anfangskonzentration pro Tag etwa sechsmal so viel Methanol oxidiert als in Aufschlammungen von OG. Die Oxidationsrate von HEG 6, einem Boden, der vor dem Versuchsstart etwa ein Jahr lang bei  $5^\circ\text{C}$  gelagert worden war, war etwa um den Faktor 10 niedriger als die Oxidationsraten der Bodenaufschlammungen von FG (Tab.41).

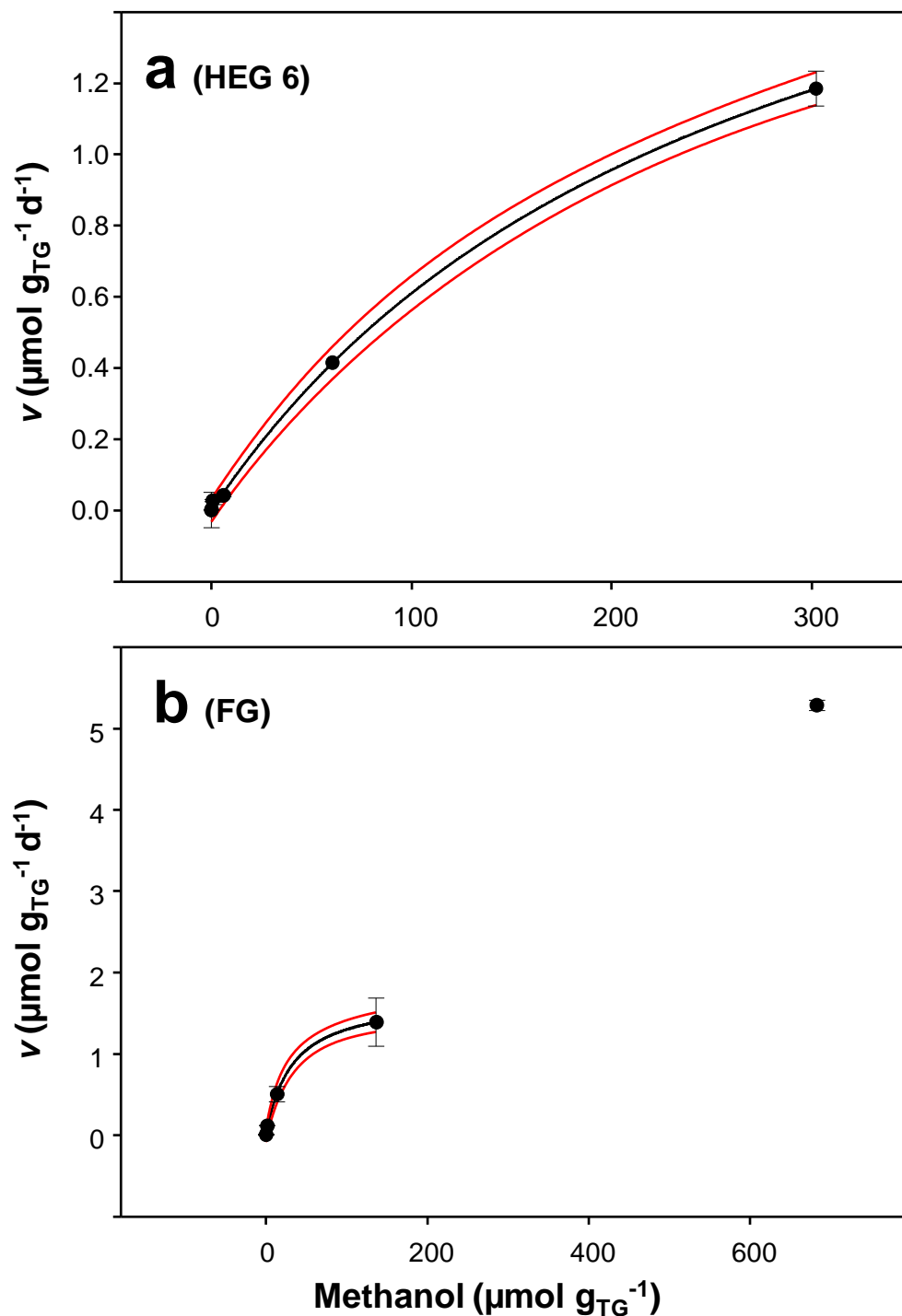
**Tab. 42:** Apparente kinetische Parameter der Grünlandböden OG, FG und HEG 6. Die Dissimilationsraten bei  $0,07 \mu\text{mol Methanol g}_{\text{TG}}^{-1}$  von FG und HEG 6 wurden basierend auf der linearen Auftragung der gemittelten Oxidationsraten der Duplikate gegen die Methanolkonzentration berechnet. Die Dissimilationsrate von OG wurde direkt durch Hinzufügen von  $0,07 \mu\text{mol Methanol g}_{\text{TG}}^{-1}$  (entspricht  $10 \mu\text{M}$ ) zur Bodenaufschlammung bestimmt.

Boden	Dissimilationsrate bei einer Anfangskonzentration von $0,07 \mu\text{mol}$ Methanol $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$ ( $\mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{d}^{-1}$ )	$v_{\text{max}}$ ( $\mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{d}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$ )	$a_s^0$ ( $\text{d}^{-1}$ )
OG S1	0,001	-	-	-
OG S2	0,001	-	-	-
FG S1	0,005	1,3 (0,1) <sup>a</sup>	17,9 (0,8) <sup>a</sup>	0,07
FG S2	0,007	2,2 (<0,1) <sup>a</sup>	54,2 (9,0) <sup>a</sup>	0,04
HEG 6 S1	0,0006	2,4 (0,1) <sup>a</sup>	285,6 (25,1) <sup>a</sup>	0,01
HEG 6 S2	0,0006	2,1 (<0,1) <sup>a</sup>	242,8 (20,2) <sup>a</sup>	0,01

Abkürzungen: S, Bodenaufschlammung;  $v_{\text{max}}$ , apparente maximale Reaktionsgeschwindigkeit;  $K_m$ , apparente Michaelis-Menten-Konstante;  $a_s^0$ , spezifische Affinität;  $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$ , pro g Trockengewicht des Bodens;  $\text{d}^{-1}$ , pro Tag.

<sup>a</sup>in Klammern sind die Standardabweichungen der berechneten Parameter angegeben.

Durch die lineare Auftragung der Oxidationsraten gegen die Methanolkonzentration zur Bestimmung von apparenten Michaelis-Menten-Kinetiken von FG und HEG 6 ergaben sich Hyperbel-Kurven (Abb. 9). Die Oxidationsgeschwindigkeit von FG bei der höchsten Methanolkonzentration befand sich außerhalb der Hyperbel-Kurve. Der Datenpunkt für die höchste Methanolkonzentration wurde daher bei der Ermittlung der apparenten kinetischen Parameter nicht berücksichtigt.

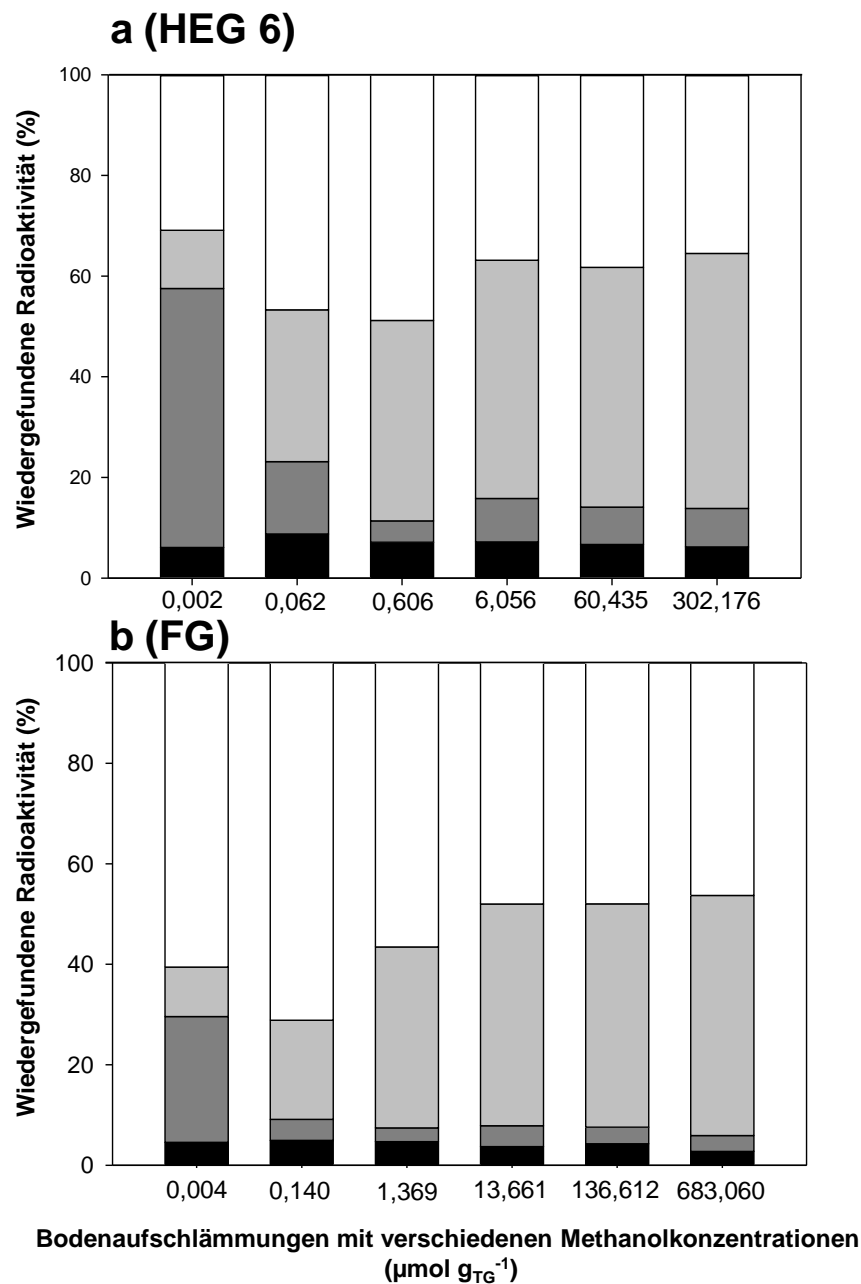


**Abb. 9:** Lineare Auftragung der gemittelten Oxidationsraten der Duplikate gegen die Methanolkonzentration zur Bestimmung von apparenten Michaelis-Menten-Kinetiken. a, Grünlandboden HEG 6; b, Grünlandboden FG. Rote Linie, die vorhergesagte Kurve lag mit einer 95%igen Wahrscheinlichkeit in diesem Bereich.  $R^2$  war für beide Regressionen  $>0,99$ . Die Regressionsanalyse wurde mit dem Programm Sigma Plot (Version 10.0, Systat Software Inc, Segel 1993) durchgeführt. Dargestellt sind gemittelte Werte aus je zwei Ansätzen zusammen mit der Standardabweichung.

Die apparenten  $v_{max}$ -Werte und  $K_m$ -Werte der Bodenaufschlammungen von FG und HEG 6 unterschieden sich (Tab. 42). Die apparenten  $v_{max}$ -Werte der Bodenaufschlammungen von FG lagen im Bereich von  $1,75 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}\text{d}^{-1}$ . Die apparenten  $v_{max}$ -Werte der Bodenaufschlammungen von HEG 6 lagen im Bereich von  $2,3 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}\text{d}^{-1}$ . Durch Miteinbeziehen der Faktoren Trockengewicht der Böden und Ansatzvolumen (2.6.4) ergeben sich für FG und HEG 6 die apparenten  $v_{max}$ -Werte  $0,13 \text{ mM Methanol d}^{-1}$  und  $0,37 \text{ mM Methanol d}^{-1}$ . Die apparenten  $K_m$ -Werte der beiden Bodenaufschlammungen von HEG 6 waren etwa um den Faktor 100 höher als die apparenten  $K_m$ -Werte der beiden Bodenaufschlammungen von FG. Die apparenten  $a_s^0$ -Werte für FG und HEG 6 waren zueinander ähnlich und lagen im Bereich von  $0,01 \text{ d}^{-1}$  bis  $0,07 \text{ d}^{-1}$  (Tab. 42).

### 3.2.2 Wiederfindung des radioaktiv-markierten Kohlenstoffs

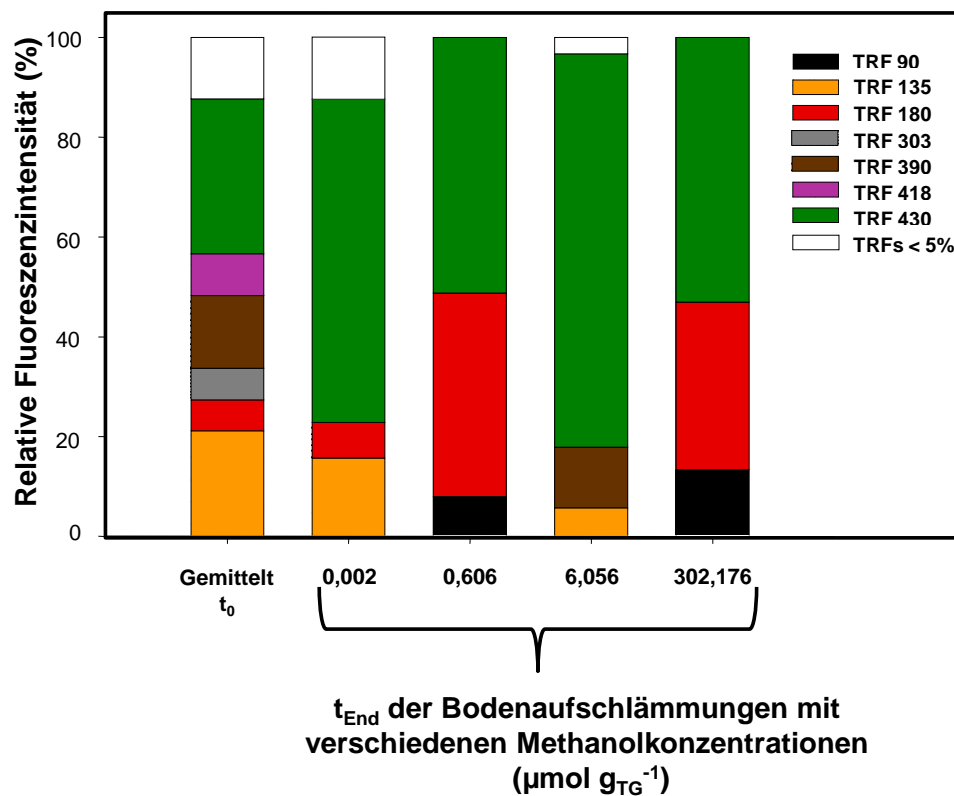
In den Ansätzen zur Bestimmung der kinetischen Parameter von HEG 6 und FG wurden nach Beendigung der Versuche mindestens 46% (HEG 6) bzw. 31% (FG) der ursprünglich eingesetzten Radioaktivität wiedergefunden (graue und schwarze Bereiche der Balken in Abb. 10). Die Messung der Radioaktivität vor und nach der Trocknung des Bodens HEG 6 ergab, dass ein geringer Anteil der Radioaktivität (etwa 15%) während des Trocknungsprozesses im Abzug verloren gegangen sind. Es ist sehr wahrscheinlich, dass ein Großteil der nicht wiedergefundenen Radioaktivität als  $^{14}\text{CO}_2$  vorlag, das nicht durch die zweistufige  $\text{CO}_2$ -Falle aufgefangen wurde. In der Abb. 10 wird die nicht detektierte Radioaktivität daher als nicht aufgefangenes  $^{14}\text{CO}_2$  bezeichnet und im Folgenden zusammen mit detektiertem  $^{14}\text{CO}_2$  und  $^{14}\text{C}$ -Carbonat zu der Gesamtmenge an  $^{14}\text{CO}_2$  gezählt. In den Ansätzen mit HEG 6 und einer Anfangskonzentration von  $0,002 \mu\text{mol Methanol g}_{\text{TG}}^{-1}$  wurden 42% des eingesetzten radioaktiv-markierten Kohlenstoffs zu  $^{14}\text{CO}_2$  umgesetzt (weiße und hellgraue Bereiche der Balken in Abb. 10 a), während in der wässrigen Phase der relative Anteil an Radioaktivität bei 51% lag (Abb. 10). Bei allen anderen Versuchsansätzen mit Boden wurde der größte Anteil der eingesetzten Radioaktivität in Form von  $^{14}\text{CO}_2$  detektiert (Abb. 10). In Ansätzen ohne Boden wurden 75% der eingesetzten Radioaktivität wiedergefunden. Hierbei handelt es sich um einen gemittelten Wert aus 12 Ansätzen mit unterschiedlicher Anfangskonzentration an Methanol. 7% des  $^{14}\text{C}$ -Methanols wurden zu  $^{14}\text{CO}_2$  umgesetzt. Der Großteil der Radioaktivität wurde bei Beendigung der Versuche ohne Boden in der wässrigen Phase wiedergefunden.



**Abb. 10:** Wiedergefundene Radioaktivität. Weiß, nicht aufgefangenes  $^{14}\text{CO}_2$ ; Hellgrau,  $^{14}\text{CO}_2$  und ausgegastes  $^{14}\text{C}$ -Carbonat; Dunkelgrau, Radioaktivität in der wässrigen Phase; Schwarz, Radioaktivität im Boden. Die absoluten Mengen an Radioaktivität (dpm), die in den Reaktionsgefäßen der  $\text{CO}_2$ -Fälle (Abb. 4) aufgefangen wurden, sind in Tab. C im Anhang aufgelistet.

### 3.2.3 Effekt von Methanol auf die *mch*-Genotypenzusammensetzung im Boden

Die TRFLP-Analyse (2.8.7) von *mch* aus Proben der Aufschlammungen von HEG 6 mit supplementiertem Methanol ( $0,002 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$ ,  $0,606 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$ ,  $6,056 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$  und  $302,176 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$ ) ergab, dass sieben TRFs (TRF 90, TRF 135, TRF 180, TRF 303, TRF 390, TRF 418, TRF 430) in den Aufschlammungen am häufigsten vertreten waren. Im Vergleich zum Zeitpunkt  $t_0$  nahm die Anzahl TRFs für *mch* in Bodenaufschlammungen von HEG 6 durch die Inkubation mit Methanol bei allen Substratkonzentrationen ab. Das TRF 430 wurde im Laufe der Inkubation mit Methanol bei allen Substratkonzentrationen angereichert. Bei den Konzentrationen  $6,056 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$  und  $302,176 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$  kam es zu einer Anreicherung von TRF 180 (Abb. 11).



**Abb. 11:** Relative Fluoreszenzintensitäten der *mch*-TRFs in Bodenaufschlammungen von HEG 6 nach Supplementation von Methanol. Die Oxidationsraten für die Substratkonzentrationen  $0,002 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$ ,  $0,606 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$ ,  $6,056 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$  und  $302,176 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$  waren  $0,001 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ,  $0,027 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ,  $0,041 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{ d}^{-1}$  und  $1,185 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Die relativen Fluoreszenzintensitäten für  $t_0$  sind gemittelte Werte für vier Bodenaufschlammungen. Die relativen Fluoreszenzintensitäten für die Zeitpunkte  $t_{\text{END}}$  sind gemittelte Werte für je zwei Bodenaufschlammungen.

Die zwei TRFs 430 und 180 wurden zwei Genotypen zugeordnet. Sie werden im Folgenden als GSC 1 und GSC 2 („Grassland Soil Cluster 1“, „Grassland Soil Cluster 2“) bezeichnet. Anhand des phylogenetischen Mch-Baumes wurden GSC 1 und GSC 2 den *Alphaproteobacteria* zugeordnet (Abb. 12). Die nächst verwandten kultivierten Organismen waren für GSC 1 *Starkeya novella* DSM 506 mit einer Aminosäuresequenz-Distanz von 30,9% und für GSC 2 *Methylocella silvestris* BL2 mit einer Aminosäuresequenz-Distanz von 28,9%.



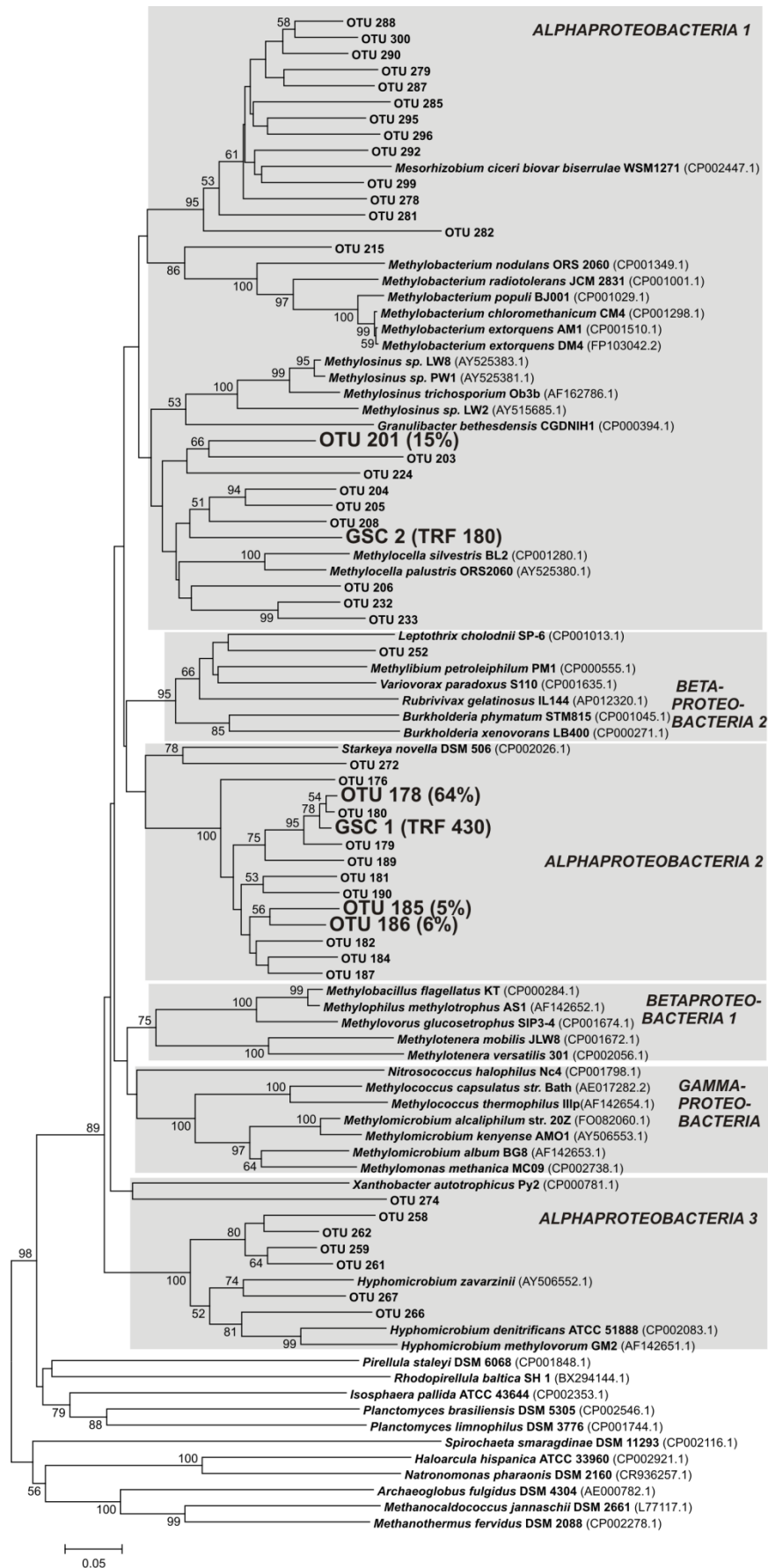


Abb.12: Phylogenetischer Mch-Baum.

**Legende zu Abb. 12:** Phylogenetischer Mch-Baum. Die Genotypen GSC 1 und GSC 2 wurden in Aufschlammungen von HEG 6 durch *in situ* relevante Methanolkonzentrationen angeregt (3.2.3). Der Cut-Off-Wert zur Datensatz basierten Differenzierung der OTUs war 80% (3.3.2). Es wurden alle OTUs des rarefizierten Datensatzes dargestellt. Hervorgehobene OTUs dominierten den Datensatz. Die Zahlenangaben in Klammern repräsentieren den prozentualen Anteil der jeweiligen OTU an der Gesamtzahl der Sequenzen. Die „Accession“-Nummern der *mch*-Sequenzen wurden in Klammern hinter die Artnamen gesetzt. Es wurden nur Bootstrap-Werte größer als 50% dargestellt.

### 3.3 Biogeographische Diversität

#### 3.3.1 Korrelation von physiologischen und Umweltparametern mit Zellzahlen

Es wurden die Zellzahlen für 12 Böden der Exploratorien mit Hilfe der MPN-Methode bestimmt (2.7.3). Die Zellzahlen in Medium mit Methanol waren höher als die Zellzahlen in Medium ohne Methanol und lagen z.B. für HEG 6 bei  $5,40 \times 10^6 \text{ g}_{\text{TG}}^{-1}$  und  $4,83 \times 10^4 \text{ g}_{\text{TG}}^{-1}$  in Ansatz 9 (Tab. 20). Die höchsten Zellzahlen wurden für AEG 2 und HEW 12 bestimmt. Die gemittelten Zellzahlen aus allen neun Ansätzen der MPN-Analyse (2.7.3, Tab. 20) lagen zwischen  $1,12 \times 10^6 \text{ g}_{\text{TG}}^{-1}$  für den Boden HEG 6 und  $2,95 \times 10^8 \text{ g}_{\text{TG}}^{-1}$  für den Boden AEG 2 (Tab. 43). Die gemittelten Zellzahlen der Böden der Exploratorien Schwäbische Alb und Hainich ( $1,11 \times 10^8 \text{ g}_{\text{TG}}^{-1}$  und  $7,03 \times 10^7 \text{ g}_{\text{TG}}^{-1}$  pro Boden) waren insgesamt höher als die gemittelten Zellzahlen der Böden in der Schorfheide-Chorin ( $1,08 \times 10^7 \text{ g}_{\text{TG}}^{-1}$  pro Boden).

**Tab. 43:** Höchste und gemittelte Zellzahlen verschiedener Böden aus neun verschiedenen Ansätzen.

Boden	Höchste Zellzahlen ( $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	Gemittelte Zellzahlen ( $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	Standardabweichung ( $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$ )
AEG 2	$2,07 \times 10^9$	$2,95 \times 10^8$	$6,74 \times 10^8$
AEG 7	$1,89 \times 10^7$	$6,35 \times 10^6$	$7,26 \times 10^6$
AEW 5	$5,39 \times 10^8$	$1,27 \times 10^8$	$2,10 \times 10^8$
AEW 8	$7,74 \times 10^7$	$1,74 \times 10^7$	$2,62 \times 10^7$
HEG 6	$4,10 \times 10^6$	$1,12 \times 10^6$	$1,58 \times 10^6$
HEG 9	$1,10 \times 10^8$	$1,58 \times 10^7$	$3,55 \times 10^7$
HEW 5	$5,37 \times 10^7$	$1,01 \times 10^7$	$1,69 \times 10^7$
HEW 12	$1,14 \times 10^9$	$2,54 \times 10^8$	$5,01 \times 10^8$
SEG 2	$7,15 \times 10^7$	$9,09 \times 10^6$	$2,36 \times 10^7$
SEG 6	$1,15 \times 10^7$	$3,52 \times 10^6$	$4,02 \times 10^6$
SEW 5	$5,80 \times 10^7$	$1,07 \times 10^7$	$1,80 \times 10^7$
SEW 9	$1,48 \times 10^7$	$1,98 \times 10^7$	$4,81 \times 10^7$

Abkürzung:  $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$ , pro Gramm Trockengewicht des Bodens.

<sup>a</sup>Basierend auf Ebertsch, 2009; Glowik, 2008.

Die Berechnung der logarithmierten Differenzen zwischen den Zellzahlen der Ansätze in Medium M1 mod mit pH 6,8 (Ansätze 5 bis 8, Tab. 20) und Zellzahlen der Ansätze in Medium M1 mod mit pH 3,1 (Ansätze 1 bis 4, Tab. 20) ergab in 39 von 48 Fällen einen Wert, der größer war als der Logarithmus der zu sichernden Differenz (Tab. 44). Das bedeutet, dass die Zellzahlen in pH-neutralem Medium signifikant höher waren als in dementsprechenden sauren Medium. Ein Vergleich der Zellzahlen der Ansätze mit Medium M1 mod mit (Ansätze 3, 4, 7, 8; Tab. 20) und ohne Nitrat (Ansätze 1, 2, 5, 6; Tab. 20) ergab in 25 von 48 Fällen einen signifikanten Unterschied (Tab. 44). In 22 Fällen führte die Zugabe von Nitrat zu signifikant höheren Zellzahlen. In drei Fällen ergaben sich durch die Zugabe von Nitrat signifikant niedrigere Zellzahlen. Zellzahlen der Ansätze mit Medium mod mit Vitamine (Ansätze 2, 4, 6, 8; Tab. 20) waren in 17 von 48 Fällen signifikant verschieden von den Zellzahlen der Medien ohne Vitamine (Ansätze 1, 3, 5, 7; Tab. 20). In acht Fällen waren die Zellzahlen in Medien ohne Vitamine signifikant erhöht, in neun Fällen signifikant erniedrigt (Tab. 44). Zusammenfassend kann man sagen, dass die physiologischen Parameter pH-Wert und Nitratkonzentration die gemessenen Zellzahlen positiv beeinflussten, während Vitamine im Medium keinen eindeutigen Effekt auf die Zellzahlen hatten. Die Ansätze mit Medium 125 wurden in dieser Analyse nicht berücksichtigt, da das Medium selbst einen Einfluss haben könnte und die Inkubationszeit deutlich geringer war.

**Tab. 44:** Logarithmierte Differenzen der Zellzahlen der Ansätzen mit M1 mod Medium. Es wurde immer der kleinere logarithmierte Wert vom größeren logarithmierten Wert abgezogen. Werte größer als 0,516 waren signifikant und sind grau hervorgehoben.

Boden	Logarithmierte Differenz zwischen den Ansätzen <sup>a</sup>											
	1 und 2	3 und 4	5 und 6	7 und 8	1 und 3	2 und 4	5 und 7	6 und 8	1 und 5	2 und 6	3 und 7	4 und 8
AEG 2	1,12	0,22	1,54	1,43	0,40	0,95	3,50	0,52	1,00	1,42	4,10	2,89
AEG 7	0,05	0,04	0,02	0,15	1,07	1,06	0,50	0,34	2,11	2,08	1,54	1,36
AEW 5	0,80	0,16	0,66	0,15	0,56	0,08	0,46	0,34	3,48	3,34	3,38	3,08
AEW 8	0,15	0,30	0	0,34	0,15	0,30	0,90	1,24	0,37	0,52	1,43	2,07
HEG 6	0,68	0,60	0,30	0,31	0,65	0,42	0,94	0,93	0,35	1,02	1,24	1,53
HEG 9	0,48	0,19	0,07	0,33	0,11	0,78	0,78	1,18	1,85	2,26	2,51	2,65
HEW 5	1,77	0,23	0,30	0	1,57	0,43	0,66	0,36	2,19	0,72	1,28	1,52
HEW 12	0,52	0,33	2,67	2,44	1,31	0,45	0,37	0,14	1,64	3,79	0,70	3,47
SEG 2	0,08	0,07	0,59	1,35	0,15	0	3,14	2,39	1,35	0,68	4,45	3,07
SEG 6	0,48	0,94	0,45	1,45	0,16	1,26	2,00	1,00	1,65	0,73	3,49	2,99
SEW 5	0,50	0	0,63	0,10	0,57	0,07	0,66	0,07	0,36	0,50	0,46	0,36
SEW 9	0,44	0,11	1,03	0,11	0,36	0,69	0,33	0,81	0,83	0,24	0,15	0,36

<sup>a</sup>Tab. 20.

Der Test auf Normalverteilung ergab, dass die Zellzahlen von acht der neun Ansätze nicht signifikant aus einer normalverteilten Grundgesamtheit gezogen wurden (Tab. 45). Der Rangkorrelationstest nach Spearman (2.11.3.1), berechnet für höchste bzw. gemittelte Zellzahlen und metrisch skalierte Umweltparameter, ergab P-Werte zwischen 0,278 und

0,956. Es lag keine signifikante Korrelation der höchsten oder gemittelten MPNs mit metrisch skalierten Umweltparametern vor. Der U-Test nach Mann und Whitney (2.11.3.2) ergab P-Werte zwischen 0,128 bis 0,936. Unterschiedliche Vegetationstypen und Landnutzungsintensitäten zeigten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der höchsten oder mittleren Zellzahlen.

**Tab. 45:** Ergebnisse des Normalverteilungstests nach Shapiro-Wilk für die relativen Häufigkeiten der Zellzahlen. Grau hervorgehobene Ansätze repräsentieren Daten, die nicht signifikant aus einer normalverteilten Grundgesamtheit gezogen wurden.

Ansatz <sup>a</sup>	W
1	$7,304 \times 10^{-4}$
2	$1,112 \times 10^{-5}$
3	$1,000 \times 10^{-3}$
4	$1,000 \times 10^{-3}$
5	$6,201 \times 10^{-5}$
6	$1,866 \times 10^{-4}$
7	$4,100 \times 10^{-2}$
8	$1,420 \times 10^{-1}$
9	$1,000 \times 10^{-3}$

Abkürzung: W, Wahrscheinlichkeit.

<sup>a</sup>Tab. 20.

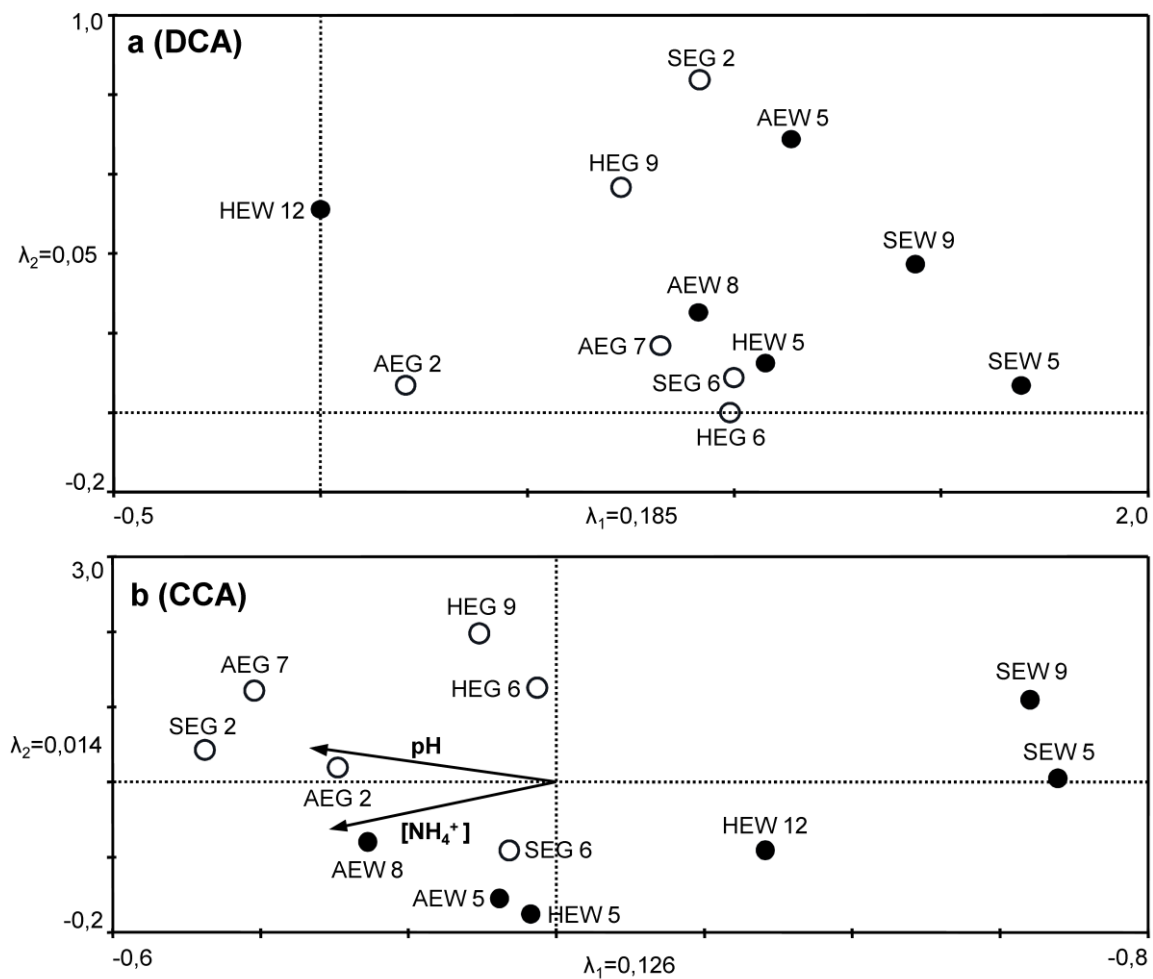
Während im Rangkorrelationstest nach Spearman (2.11.3.1) und im U-Test (2.11.3.2) Zellzahlen der einzelnen Medien hinsichtlich einer Korrelation mit Umweltparameter getestet wurden, ging in die Korrespondenzanalyse der gesamte MPN-Datensatz ein. Die DCA ergab eine Gradientenlänge von 1,649 SD. Sowohl in der DCA- als auch in der CCA-Ordination waren die Aufnahmepunkte der Waldböden separiert von denen der Grünlandböden. Die CCA mit Monte Carlo Test ergab eine signifikante Korrelation des Datensatzes der Zellzahlen mit den Umweltparametern pH-Wert und Ammoniumkonzentration (Tab. 46). Vegetationstyp, Landnutzungsintensität, gravimetrischer Wassergehalt, Nitratkonzentration, Gesamtkohlenstoff- und Stickstoffgehalt korrelierten nicht mit den relativen Häufigkeiten (Tab. 46). Die Trace-Werte waren kleiner als 0,5 (Tab. 46). Die Variation, die durch die Ordinationsachsen dargestellt wurde, war folglich gering.

**Tab. 46:** Ergebnisse des Monte Carlo Tests für relative Häufigkeiten der Zellzahlen und Umweltparameter. Grau hervorgehobene Umweltparameter zeigten eine signifikante Korrelation ( $P < 0,05$ ).

Umweltparameter	P	Trace
Vegetationstyp	0,2756	0,052
Landnutzungsintensität	0,9388	0,014
pH	0,0069	0,109
[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]	0,1498	0,063
[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ]	0,0267	0,095
[C]	0,6954	0,023
[N]	0,7279	0,023
[H <sub>2</sub> O]	0,1975	0,059

Abkürzungen: [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>], Nitratkonzentration; [NH<sub>4</sub><sup>+</sup>], Ammoniumkonzentration; [C], Gesamtkohlenstoffgehalt; [N], Gesamtstickstoffgehalt; [H<sub>2</sub>O], gravimetrischer Wassergehalt.

Die Ergebnisse wurden in Form eines CCA-Ordinationsdiagrammes zusammengefasst. Auf Grund der geringen Gradientenlänge wurde die Biplot-Skalierung gewählt und der Fokus auf die Artenbeziehung gelegt (Abb. 13). Die Eigenwerte der DCA und der CCA waren unter 0,5. Die Variabilität, die durch die Ordinationsachsen erklärt wurde, war gering. Die Eigenwerte der CCA waren kleiner als die Eigenwerte der DCA. Die relativen Positionen der Aufnahmepunkte wie z.B. die Aufnahmepunkte von HEG 9 und HEG 6 unterschieden sich in der DCA und der CCA (Abb. 13). Dies weist darauf hin, dass diejenigen Umweltparameter, die die beste Korrelation mit dem gesamten Datensatz der Zellzahlen zeigten, in dieser Studie nicht erfasst wurden.

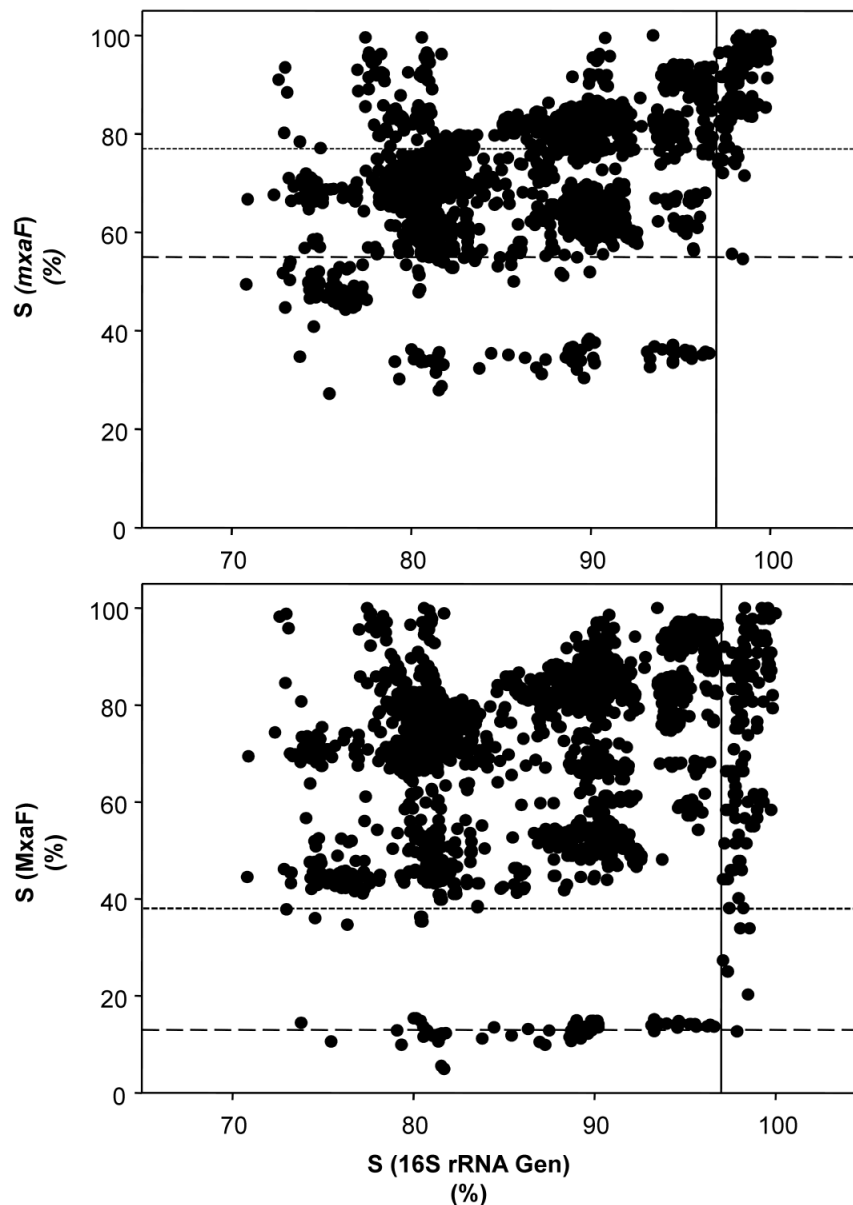


**Abb. 13:** CA der relativen Häufigkeiten der Zellzahlen. a, Aufnahmen in der DCA; b, Aufnahmen und signifikant-korrelierende Umweltparameter in der CCA; Kreise, Bodenproben; Pfeile, metrische Umweltparameter; Schwarze Symbole, Daten von Waldböden; Weiße Symbole, Daten von Grünlandböden;  $\lambda_1$ , Eigenwert der ersten Ordinationsachse;  $\lambda_2$ , Eigenwert der zweiten Ordinationsachse.

### 3.3.2 Cut-Off-Wert zur Differenzierung von OTUs

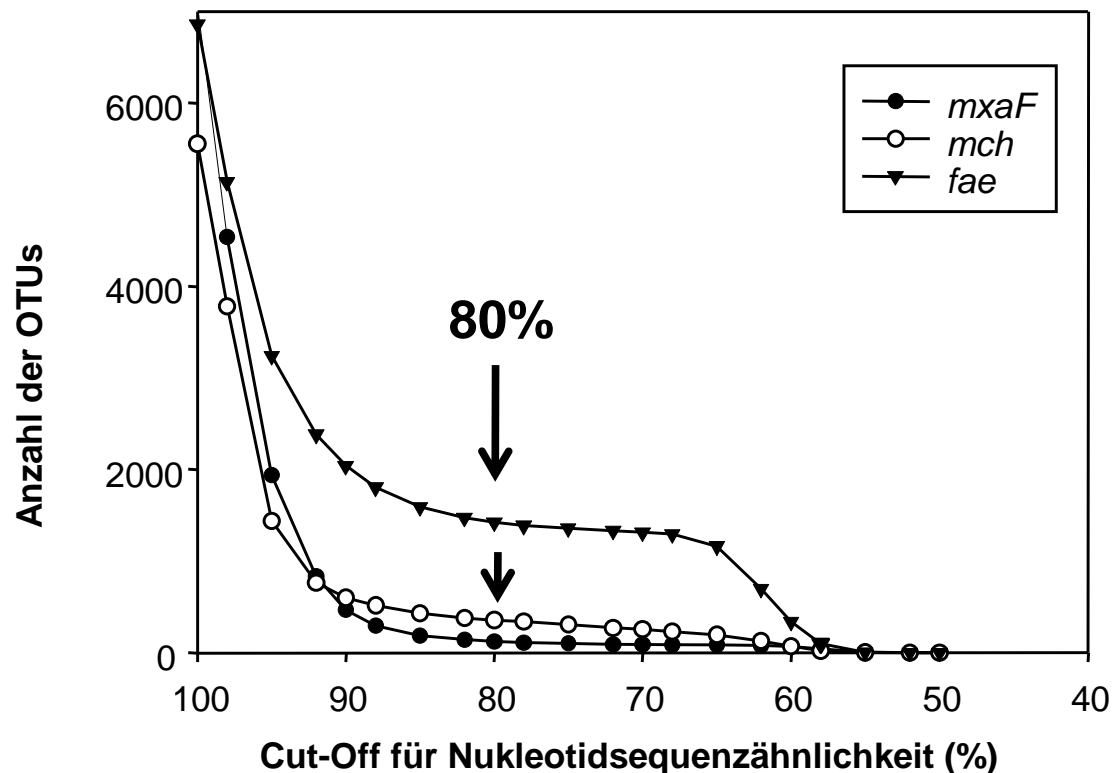
Zur Bestimmung der Cut-Off-Werte zur Differenzierung von *mxoF*-, *mch*- und *fae*-OTUs auf Speziesebene (2.8.9.3.1) wurden Ähnlichkeitskoeffizienten von funktionellen Genen und die entsprechenden Ähnlichkeitskoeffizienten der 16S rRNA Gene (Tab. 35, Tab. 36, Tab. 37) korreliert. Mit steigender Ähnlichkeit der 16S rRNA Gensequenz der betrachteten Stämme zur Bestimmung des Cut-Off-Wertes zur Differenzierung von OTUs auf Speziesebene (2.8.9.3.1) stieg auch die Ähnlichkeit der funktionellen Gene *mxoF*, *mch* und *fae* (Abb. 14, Abb. 15, Abb. 16). Eine 16S rRNA Gen Ähnlichkeit von 97% gilt als Schwellenwert zur Unterscheidung zweier Arten (Stackebrandt und Ebers, 2006; Stackebrandt und Goebel, 1994). Eine *mxoF*-Sequenzähnlichkeit von mindestens 55%, bzw. mindestens 13% auf

Aminosäurelevel, ging mit einer 16S rRNA Sequenzähnlichkeit von mindestens 97% einher. 90% der Stämme, deren 16S rRNA Gene eine Sequenzähnlichkeit von mindestens 97% hatten, zeigten eine *mxoF*-Sequenzähnlichkeit von mindestens 77% (38% auf Aminosäurelevel) (Abb. 14). *mxoF*-Sequenzen mit einer Ähnlichkeit kleiner 77% gehören folglich zu unterschiedlichen Spezies. Als Cut-Off-Wert zur Unterscheidung von *mxoF*-OTUs wurde daher 77% gewählt.



**Abb. 14:** Korrelation der Ähnlichkeitskoeffizienten S von DNA- bzw. *in silico* translatierten *mxoF*-Sequenzen mit den entsprechenden Ähnlichkeitskoeffizienten der 16S rRNA Gene. Die durchgezogene Linie markiert eine 16S rRNA Gensequenzähnlichkeit von 97%. Die gepunktete Linie markiert den Cut-Off-Wert, berechnet für 90% der betrachteten Stämme. Die gestrichelte Linie markiert den Cut-Off-Wert, berechnet für alle betrachteten Stämme.

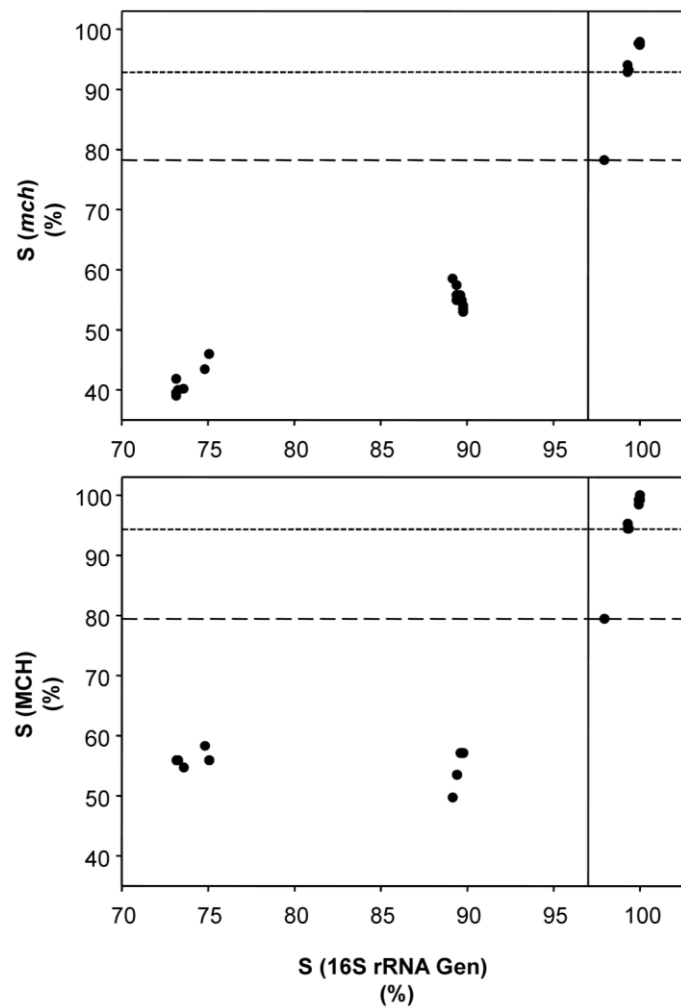
Der Cut-Off-Wert zur Unterscheidung der *mxoF*-OTUs auf Speziesebene war in der gleichen Größenordnung wie der Datensatz-basierte Cut-Off-Wert (2.8.9.3.2). Bis zu einem Cut-Off-Wert für die *mxoF*-Sequenzähnlichkeit von maximal 80% blieb die Anzahl der erhaltenen OTUs konstant (Abb. 15). Eine Überschätzung der Anzahl der OTUs bei dem für weitere Analysen gewählten Cut-Off von 77% ist daher unwahrscheinlich.



**Abb. 15:** Korrelation der Anzahl der erhaltenen OTUs mit verschiedenen Cut-Off-Werten von *mxoF*, *mch* und *fae*. Der Cut-Off-Wert zur Unterscheidung von *mch*- und *fae*-OTUs war 80% (Pfeile).

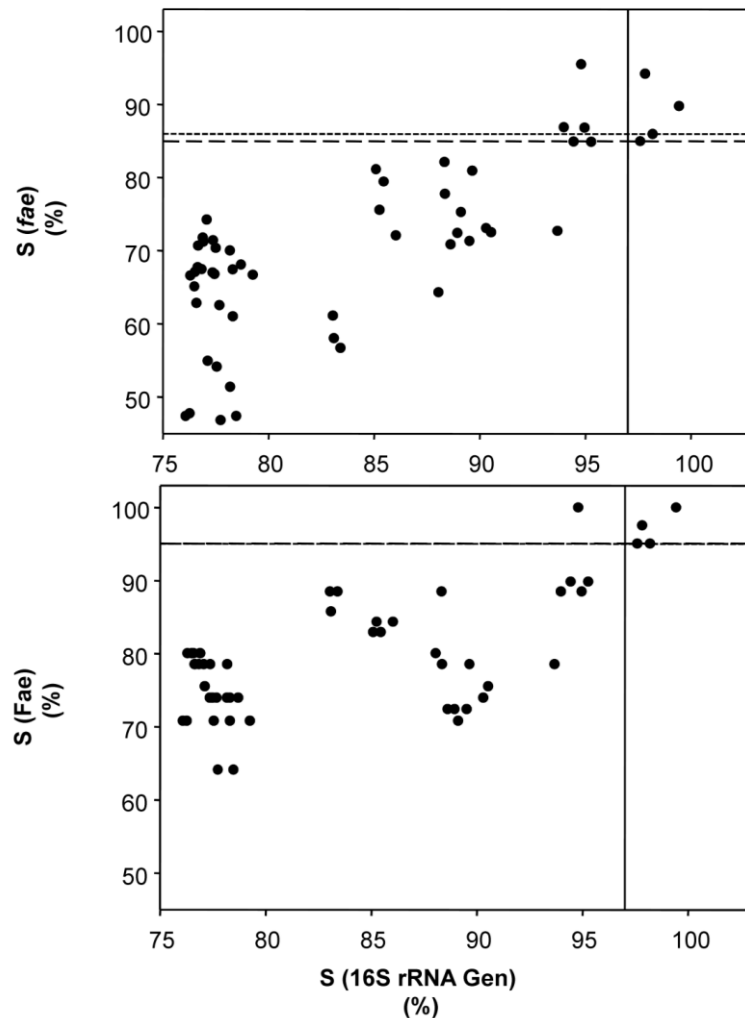
Die Analyse der *mch*-Sequenzen von acht verschiedenen Stämmen (Tab. 36) zusammen mit den entsprechenden 16S rRNA Gensequenzen ergab, dass 90% der Stämme mit einer 16S rRNA Gensequenzähnlichkeit von mindestens 97% *mch*-Gene mit einer Sequenzähnlichkeit von mindestens 93% enthielten (Abb. 16). Auf Grund der geringen Datenmenge, die für die Bestimmung eines Cut-Off-Wertes zur Artendifferenzierung zu Verfügung stand, wurde der Datensatz-basierte Richtwert verwendet, um die *mch*-Sequenzen, die durch die Amplikon-Pyrosequenzierung erhalten wurden, in OTUs einzuordnen. Ab einem Cut-Off-Wert von maximal 80% änderte sich die Anzahl der Genotypen nicht mehr wesentlich (Abb. 15).





**Abb. 16:** Korrelation der Ähnlichkeitskoeffizienten *S* von DNA- bzw. *in silico* translatierten *mch*-Sequenzen mit den entsprechenden Ähnlichkeitskoeffizienten der 16S rRNA Gene. Die durchgezogene Linie markiert eine 16S rRNA Gensequenzähnlichkeit von 97%. Die gepunktete Linie markiert den Cut-Off-Wert, berechnet für 90% der betrachteten Stämme. Die gestrichelte Linie markiert den Cut-Off-Wert, berechnet für alle betrachteten Stämme.

Die Bestimmung des Cut-Off-Wertes zur Differenzierung von *fae*-Sequenzen auf Speziesebene ergab, dass 90% der Stämme mit einer 16S rRNA Gensequenzähnlichkeit von mindestens 97% *fae*-Sequenzen mit einer Sequenzähnlichkeit von mindestens 86% enthielten (Abb. 17). Basis für diese Analyse waren Sequenzinformationen von lediglich 11 verschiedenen Stämmen (Tab. 37). Als Cut-Off-Wert für die Klassifizierung der *fae*-Sequenzen der Amplikon-Pyrosequenzierung wurde daher der Datensatz basierte Richtwert von 80% verwendet (Abb. 15).



**Abb. 17:** Korrelation der Ähnlichkeitskoeffizienten  $S$  von DNA- bzw. *in silico* translatierten *fae*-Sequenzen mit den entsprechenden Ähnlichkeitskoeffizienten der 16S rRNA Gene. Die durchgezogene Linie markiert eine 16S rRNA Gensequenzähnlichkeit von 97%. Die gepunktete Linie markiert den *fae*-Cut-Off-Wert, berechnet für 90% der betrachteten Stämme. Die gestrichelte Linie markiert den Cut-Off-Wert, berechnet für alle betrachteten Stämme. Im Diagramm für *in silico* translatierte *fae*-Sequenzen fallen die gestrichelte und die gepunktete Linie zusammen.

### 3.3.3 Beschreibung der Amplikon-Pyrosequenzierungsdatensätze von *mxoF*, *mch* und *fae*

Es wurden 73.271 *mxoF*-, 77.877 *mch*- und 55.391 *fae*-Teilsequenzen durch die Amplikon-Pyrosequenzierung erhalten (Tab. 47). Die *mxoF*-Teilsequenzen wurden aus 10 verschiedenen Böden gewonnen. *mch*- und *fae*-Teilsequenzen stammen von 11 verschiedenen Böden. Durch die Behandlung des Datensatzes mit AmpliconNoise und anschließender BLAST-Analyse wurde mehr als die Hälfte aller Sequenzen verworfen (Tab. 47).

Tab. 47: Zusammenfassung der Pyrosequenzierungsdaten.

Gen	Datensatz	Anzahl der					Stichprobenumfang <sup>e</sup>		Diversitätsindizes			
		Sequenzen <sup>a</sup>	gefilterten Sequenzen <sup>b</sup>	OTUs	OTUs (geschätzt) <sup>c</sup>	OTUs rarefiziert <sup>d</sup>	OTUs (geschätzt) rarefiziert <sup>c,d</sup>	C [%]	J'	H'	J' rarefiziert <sup>d</sup>	H' rarefiziert <sup>d</sup>
<i>mxαF</i>	AEG 2	2417	1094	13	41	12	26	99,27	0,09	0,22	0,10	0,24
	AEG 7	1358	564	10	11	9	11	99,47	0,18	0,42	0,18	0,42
	AEW 5	2181	878	11	15	9	9	99,66	0,27	0,64	0,32	0,70
	AEW 8	11786	5299	18	20	7	14	99,92	0,40	1,15	0,46	1,14
	HEG 6	11445	5000	15	16	6	8	99,94	0,06	0,20	0,09	0,15
	HEG 9	9676	4063	17	17	13	16	99,95	0,11	0,30	0,13	0,34
	HEW 5	23346	10915	22	25	10	16	99,95	0,33	1,01	0,43	0,98
	HEW 12	1993	1081	7	7	5	5	99,91	0,31	0,61	0,38	0,61
	SEG 2	5599	2211	12	13	9	11	99,86	0,08	0,19	0,11	0,24
	SEG 6	3470	1788	5	5	3	3	99,94	0,03	0,05	0,04	0,05
	<b>Gesamt</b>	<b>73271</b>	<b>32898</b>	<b>31</b>	<b>31</b>	<b>26</b>	<b>26</b>	<b>99,99</b>	<b>0,25</b>	<b>0,86</b>	<b>0,20</b>	<b>0,65</b>
<i>mch</i>	AEG 2	2066	887	10	12	10	11	99,66	0,36	0,84	0,38	0,88
	AEG 7	3028	2019	13	14	9	9	99,85	0,36	0,93	0,41	0,91
	AEW 5	9428	1860	7	7	4	4	99,95	0,40	0,78	0,56	0,78
	AEW 8	2373	704	8	10	6	6	99,57	0,28	0,59	0,31	0,55
	HEG 6	38921	9061	42	49	18	25	99,88	0,30	1,11	0,39	1,14
	HEG 9	5389	2094	28	30	19	34	99,76	0,54	1,78	0,61	1,78
	HEW 5	3754	2362	7	8	5	5	99,92	0,31	0,61	0,38	0,61
	HEW 12	4636	1703	15	17	10	12	99,82	0,17	0,46	0,18	0,42
	SEG 2	5385	5186	16	16	14	15	100,00	0,46	1,27	0,49	1,29
	SEG 6	915	474	13	21	13	21	98,73	0,40	1,02	0,40	1,02
	SEW 9	1982	153	7	8	-	-	98,69	0,72	1,39	-	-
	<b>Gesamt</b>	<b>77877</b>	<b>26503</b>	<b>70</b>	<b>76</b>	<b>44</b>	<b>65</b>	<b>99,96</b>	<b>0,33</b>	<b>1,40</b>	<b>0,36</b>	<b>1,35</b>

Fortsetzung Tab. 47.

Gen	Datensatz	Anzahl der						Stichprobenumfang <sup>e</sup>	Diversitätsindizes			
		Sequenzen <sup>a</sup>	gefilterten Sequenzen <sup>b</sup>	OTUs	OTUs (geschätzt) <sup>c</sup>	OTUs rarefiziert <sup>d</sup>	OTUs (geschätzt) rarefiziert <sup>c,d</sup>		J'	H'	J' rarefiziert <sup>d</sup>	H' rarefiziert <sup>d</sup>
fae	AEG 2	3349	1882	16	18	10	11	99,84	0,44	1,22	0,55	1,28
	AEG 7	1501	690	13	15	10	13	99,42	0,46	1,18	0,53	1,22
	AEW 5	3382	877	15	17	12	27	99,54	0,38	1,03	0,40	0,99
	AEW 8	4034	309	15	17	15	17	98,71	0,35	0,95	0,35	0,96
	HEG 6	5355	877	19	27	14	22	99,32	0,53	1,55	0,58	1,53
	HEG 9	2773	694	17	18	13	15	99,57	0,45	1,29	0,48	1,22
	HEW 5	7086	2725	25	32	9	10	99,71	0,42	1,34	0,53	1,17
	HEW 12	2025	820	8	8	5	5	99,88	0,50	1,03	0,63	1,01
	SEG 2	10977	5329	29	30	10	12	99,92	0,36	1,20	0,48	1,11
	SEG 6	5687	1295	26	33	16	19	99,46	0,52	1,70	0,56	1,56
	SEW 9	9222	2002	21	26	12	13	99,75	0,29	0,88	0,35	0,87
	Gesamt	55391	17500	63	72	44	55	99,94	0,44	1,83	0,49	1,85

Abkürzungen: OTUs, Operational Taxonomic Units; J', Evenness-Index; H', Shannon-Index.

<sup>a</sup>die *mxaf*-, *mch*-, und *fae*-Sequenzen waren mindestens 200 Bp, 207 Bp und 217 Bp lang

<sup>b</sup>nach dem Filtern mit AmpliconNoise. Die BLAST-Analyse bestätigte die Identität dieser Sequenzen

<sup>c</sup>Chao 1

<sup>d</sup>Basis für die Berechnung war der Datensatz nach der Rarefizierung auf 560 (*mxaf*), 470 (*mch*) und 300 (*fae*) Sequenzen pro Boden

<sup>e</sup>Basis für die Berechnung war der nicht rarefizierte Datensatz

Die Coverage C der drei Datensätze lag bei über 99% (Tab. 47). Der Stichprobenumfang der gesamten Datensätze war folglich ausreichend für vergleichende statistische Analysen. Die Evenness des *mxoF*-Datensatzes war geringer als die der *mch*- und *fae*-Datensätze (Tab. 47). Die Anteile der *mxoF*-OTUs an der Gesamtzahl der Sequenzen eines Genmarkers waren ungleicher verteilt als die Anteile der *mch*- und *fae*-OTUs. Der Shannon-Index des *mxoF*-Datensatzes war kleiner als die Shannon-Indizes der *mch*- und *fae*-Datensätze (Tab. 47).

### 3.3.4 Diversität von *mxoF*

Der gefilterte und nicht rarefizierte *mxoF*-Datensatz enthielt mehr als 32.000 Sequenzen, die 31 verschiedenen Spezies-Level OTUs (3.3.2) zugeordnet wurden (Tab. 47). Die Anzahl der detektierten OTUs entsprach der geschätzten OTU-Anzahl. Der Evenness-Index und der Shannon-Index von SEG 6 waren geringer als die Indizes der anderen Böden. Für SEG 6 wurde die geringste Anzahl an OTUs detektiert. Für AEW 8 wurden die höchsten Werte für Evenness-Index und Shannon-Index ermittelt. Der Boden AEG 7 lieferte die geringste Anzahl an Sequenzen (Tab. 47). Die Rarefizierung erfolgte dementsprechend auf 560 Sequenzen pro Boden. Der rarefizierte Datensatz lieferte 26 verschiedene Spezies-Level OTUs. SEG 6 und AEW 8 waren auch im rarefizierten Datensatz die Böden mit der geringsten bzw. höchsten Diversität (Tab. 47). 19 OTUs des rarefizierten Datensatzes (OTU 2, OTU 3, OTU 5, OTU 6, OTU 7, OTU 10, OTU 11, OTU 13, OTU 14, OTU 15, OTU 16, OTU 17, OTU 18, OTU 20, OTU 21, OTU 22, OTU 23, OTU 28, OTU 33) wurden anhand des phylogenetischen MxoF-Baumes der Gruppe der *Alphaproteobacteria* zugeordnet (Abb. 18). Sie enthielten 94% aller Sequenzen des nicht rarefizierten Datensatzes.

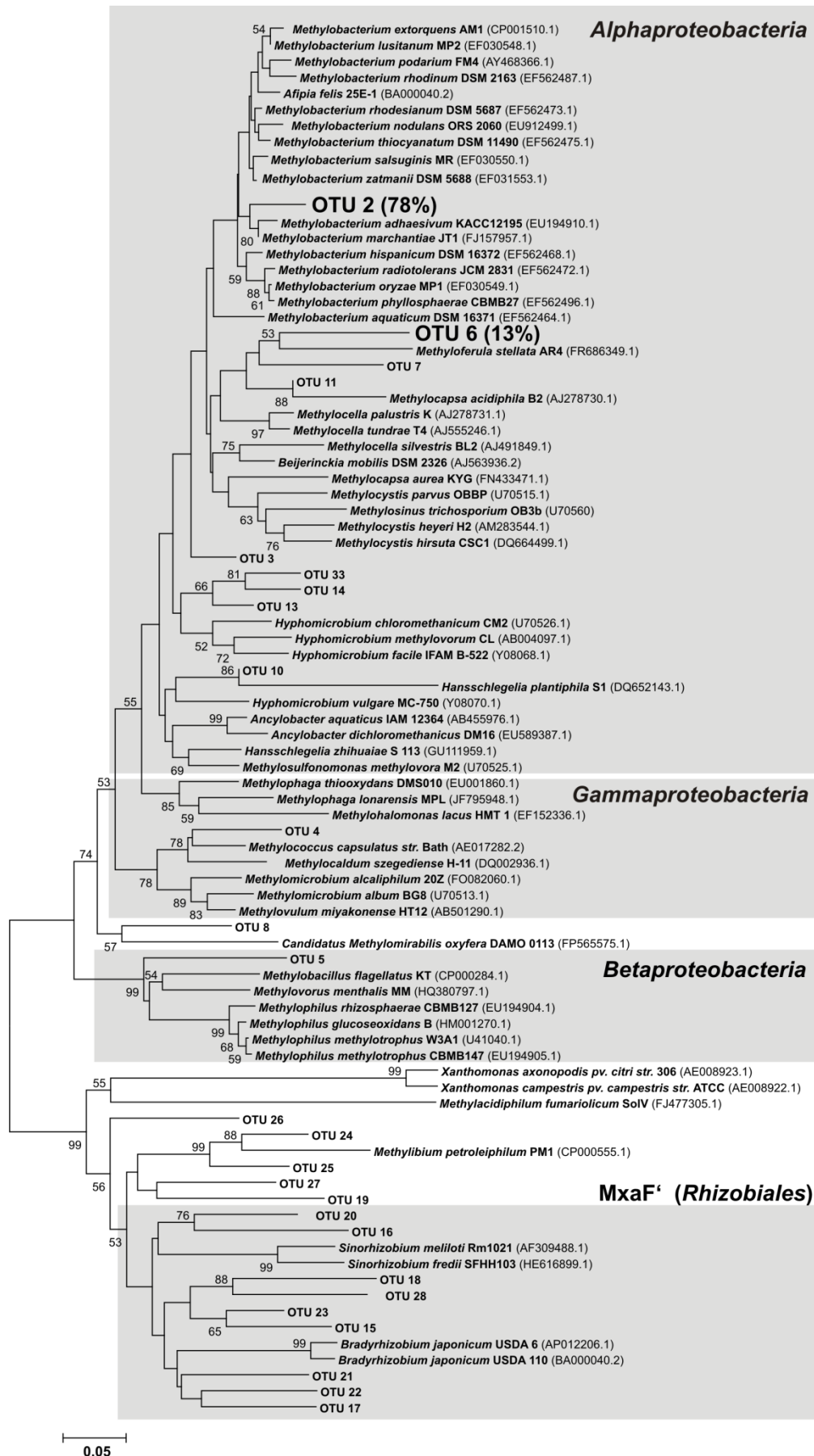
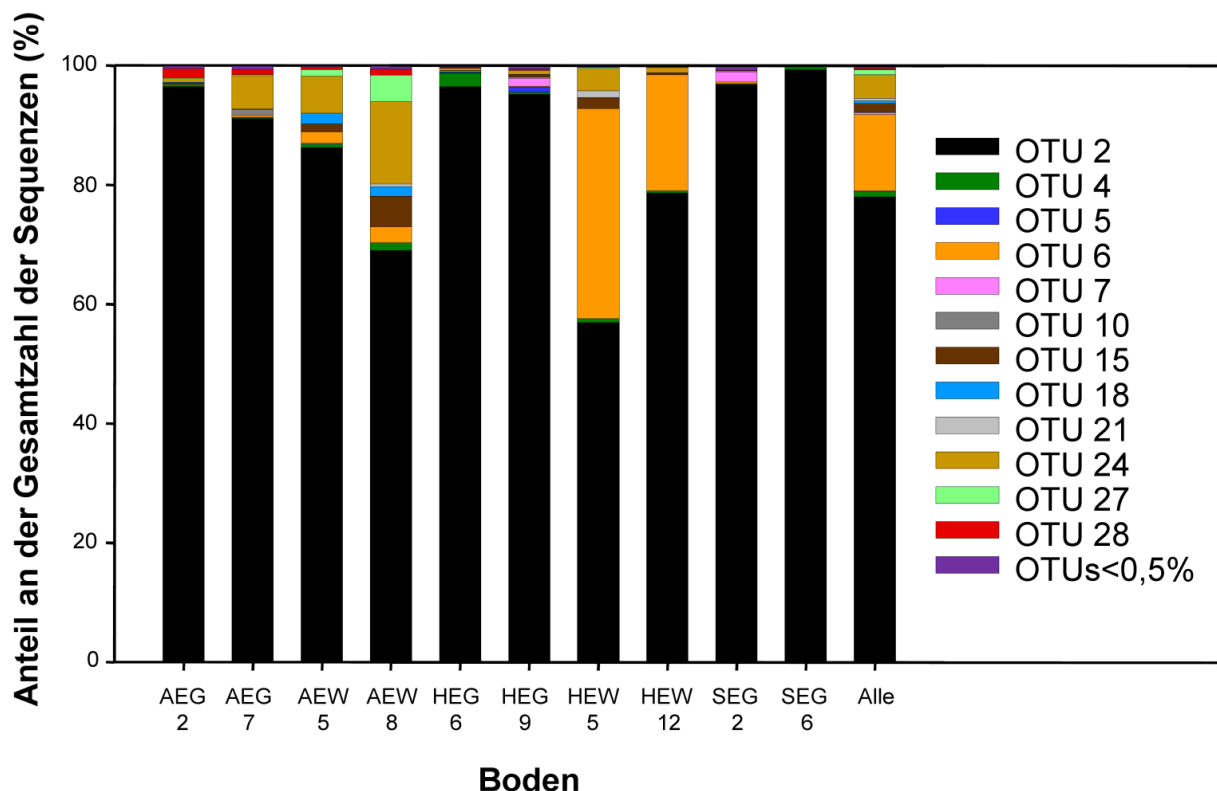


Abb. 18: Phylogenetischer MxaF-Baum.

**Legende zu Abb. 18:** Phylogenetischer *MxaF*-Baum. Der Cut-Off-Wert zur Differenzierung der OTUs war 77% (3.3.2). Es wurden alle OTUs des rarefizierten Datensatzes dargestellt. Hervorgehobene OTUs dominierten den Datensatz. Die Zahlenangaben in Klammern repräsentieren den prozentualen Anteil der jeweiligen OTU an der Gesamtzahl der Sequenzen. Die „Accession“-Nummern der *mxoF*-Sequenzen wurden in Klammern hinter die Artnamen gesetzt. Es wurden nur Bootstrap-Werte größer als 50% dargestellt.

OTU 2 und OTU 6 dominierten den Datensatz, denn sie enthielten zusammen 91% der Sequenzen des rarefizierten Datensatzes (Abb. 18). Das häufigste *mxoF*-OTU war OTU 2 und kam in allen Böden vor (Abb. 19). Es zeigte eine nahe Verwandtschaft zu *Methylobacterium* (Abb. 18) und enthielt mindestens 59% aller Sequenzen eines Bodens (Abb. 19). Das zweithäufigste *mxoF*-OTU war OTU 6. OTU 6 war vor allem in den Böden HEW 5 und HEW 12 vertreten (Abb. 19) und zeigte eine nahe Verwandtschaft zu *Methyloferula* (Abb. 18). Damit waren die beiden häufigsten *mxoF*-OTUs verwandt zu Genotypen, die zu den *Rhizobiales* gehören.



**Abb. 19:** Genotypenzusammensetzung von *mxoF* in Böden der Exploratorien Schwäbische Alb (AEG 2, AEG 7, AEW 5, AEW 8), Hainich (HEG 6, HEG 9, HEW 5, HEW 12) und Schorfheide-Chorin (SEG 2, SEG 6). Basis für diese Darstellung war der nicht rarefizierte Datensatz.

Neun OTUs innerhalb der Klasse der *Alphaproteobacteria* (OTU 15, OTU 16, OTU 17, OTU 18, OTU 20, OTU 21, OTU 22, OTU 23, OTU 28) waren verwandt zu *mxoF* von *Rhizobiales* und beinhalteten etwa 3% aller Sequenzen. OTU 5 wurde der Gruppe der *Betaproteobacteria* zugeordnet, während OTU 4 eine Verwandtschaft zu der Gruppe der *Gammaproteobacteria* zeigte (Abb. 18). Sie umfassten jeweils weniger als 1% aller Sequenzen (Abb. 19). Fünf OTUs (OTU 19, OTU 24, OTU 25, OTU 26, OTU 27) zeigten eine nahe Verwandtschaft zu *mxoF* von *Methylobium* (Abb. 18). Diese OTUs enthielten zusammen etwa 5% aller Sequenzen. OTU 8 war verwandt zu *mxoF* von *Candidatus Methylobacterium oxyfera* DAMO 0113. Weniger als 0,5% aller Sequenzen wurden diesem OTU zugeordnet.

### 3.3.5 Korrelation der *mxoF*-Genotypenzusammensetzung mit Umweltparametern

Die Verteilung der Daten ist ein wichtiges Kriterium bei der Auswahl der statistischen Methode zur Datenanalyse (2.11.2). Der Normalverteilungstest ergab, dass in den meisten Fällen keine Normalverteilung vorlag (Tab. 48) und damit der Monte Carlo Test eine geeignete Methode der multivariaten Datenanalyse war. Der Monte Carlo Test ergab eine Korrelation des *mxoF*-Datensatzes mit den Umweltparametern Vegetationstyp und pH-Wert (Tab. 49). Die Trace-Werte waren am höchsten, wenn diese beiden Parameter zur Ordination in der CCA herangezogen wurden (Tab. 49).

**Tab. 48:** Ergebnisse des Normalverteilungstests nach Shapiro-Wilk für den *mxoF*-Datensatz. Grau hervorgehobene Ansätze repräsentieren Daten, die nicht signifikant aus einer normalverteilten Grundgesamtheit gezogen wurden.

OTU	W
2	$5,703 \times 10^{-2}$
6	$8,035 \times 10^{-5}$
24	$3,240 \times 10^{-3}$
15	$4,040 \times 10^{-3}$
27	$2,113 \times 10^{-6}$
4	$1,822 \times 10^{-4}$
18	$1,052 \times 10^{-5}$
7	$1,706 \times 10^{-2}$
28	$4,530 \times 10^{-5}$
10	$1,004 \times 10^{-7}$

Abkürzungen: OTU, Operational Taxonomic Unit; W, Wahrscheinlichkeit.

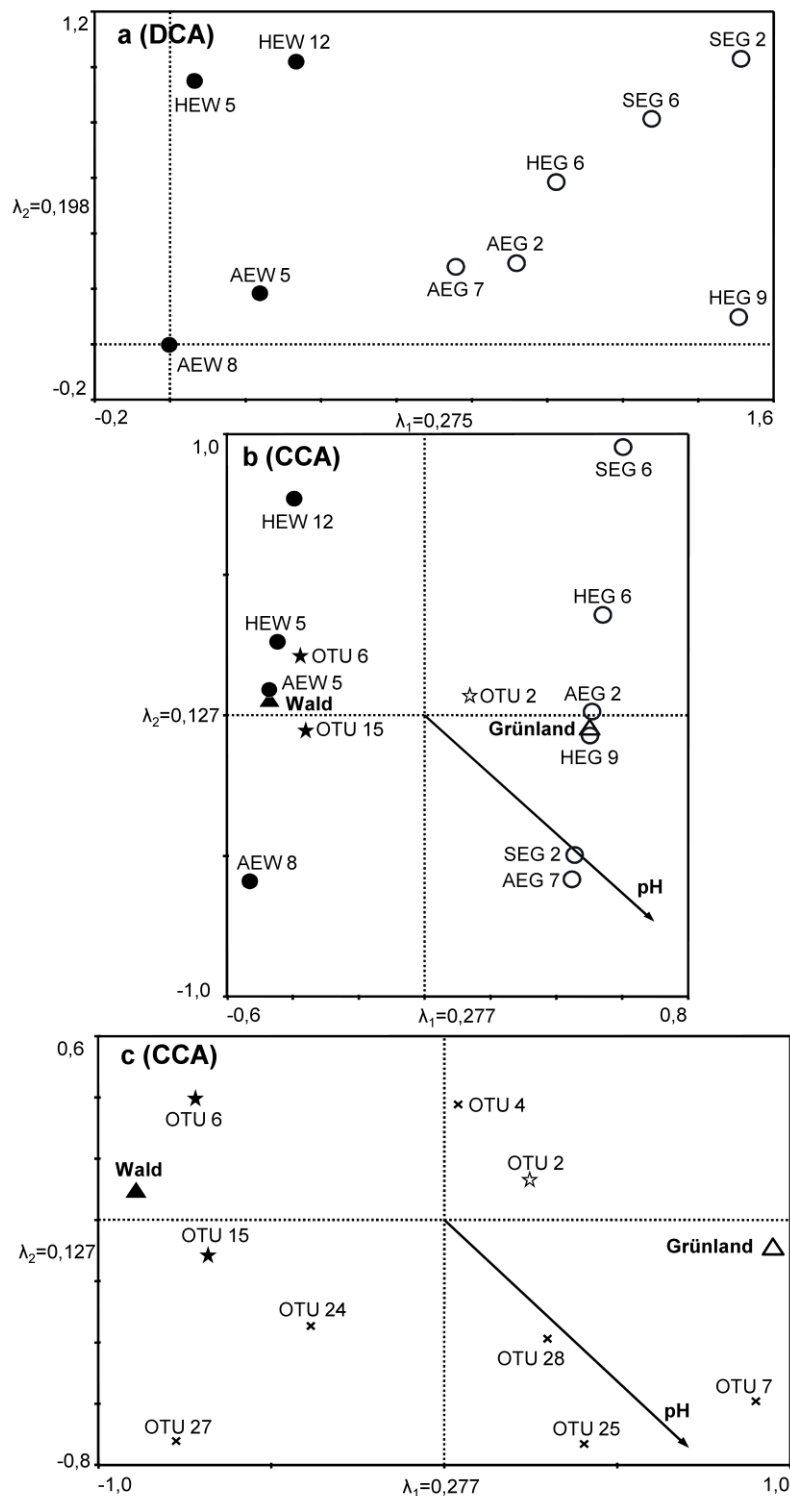


**Tab. 49:** Ergebnisse des Monte Carlo Tests für den *mx**aF*-Datensatz und Umweltparameter. Grau hervorgehobene Umweltparameter korrelierten signifikant mit dem *mx**aF*-Datensatz ( $P < 0,05$ ).

Umweltparameter	P	Trace
Vegetationstyp	0,0007	0,275
Landnutzungsintensität	0,9654	0,050
pH	0,0298	0,198
[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]	0,5518	0,099
[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ]	0,2832	0,125
[C]	0,4631	0,108
[N]	0,3741	0,116
[H <sub>2</sub> O]	0,8138	0,075

Abkürzungen: [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>], Nitratkonzentration; [NH<sub>4</sub><sup>+</sup>], Ammoniumkonzentration; [C], Gesamtkohlenstoffgehalt; [N], Gesamtstickstoffgehalt; [H<sub>2</sub>O], gravimetrischer Wassergehalt.

Die DCA ergab eine Gradientenlänge von 1,5140 SD. Zur Herstellung eines CCA-Ordinationsdiagrammes mit Art- und Aufnahmewerten wurde auf Grund der geringen Gradientenlänge die Biplot-Skalierung gewählt. Der Fokus lag auf der Artenbeziehung. Die Eigenwerte der ersten und zweiten Achse der CCA waren ähnlich zu den Eigenwerten der ersten und zweiten Achse der DCA (Abb. 20). Die Eigenwerte der DCA und CCA waren kleiner als 0,5. Die Varianz, die durch die DCA- und CCA-Achsen erklärt wurde war damit relativ gering. Die relativen Positionen der Aufnahmewerte in dem DCA- und CCA-Ordinationsdiagramm zeigten eine Trennung von Wäldern und Grünländern (Abb. 20). Die Genotypenzusammensetzung der beiden Waldstandorte der Schwäbischen Alb unterschied sich von der Genotypenzusammensetzung der Wälder des Exploratoriums Hainich (Abb. 20). Die relativen Positionen der Grünlandsymbole im DCA- und CCA-Ordinationsdiagramm unterschieden sich. Folglich wurden nicht alle wesentlichen Parameter identifiziert, die mit der OTU-Zusammensetzung korrelierten.

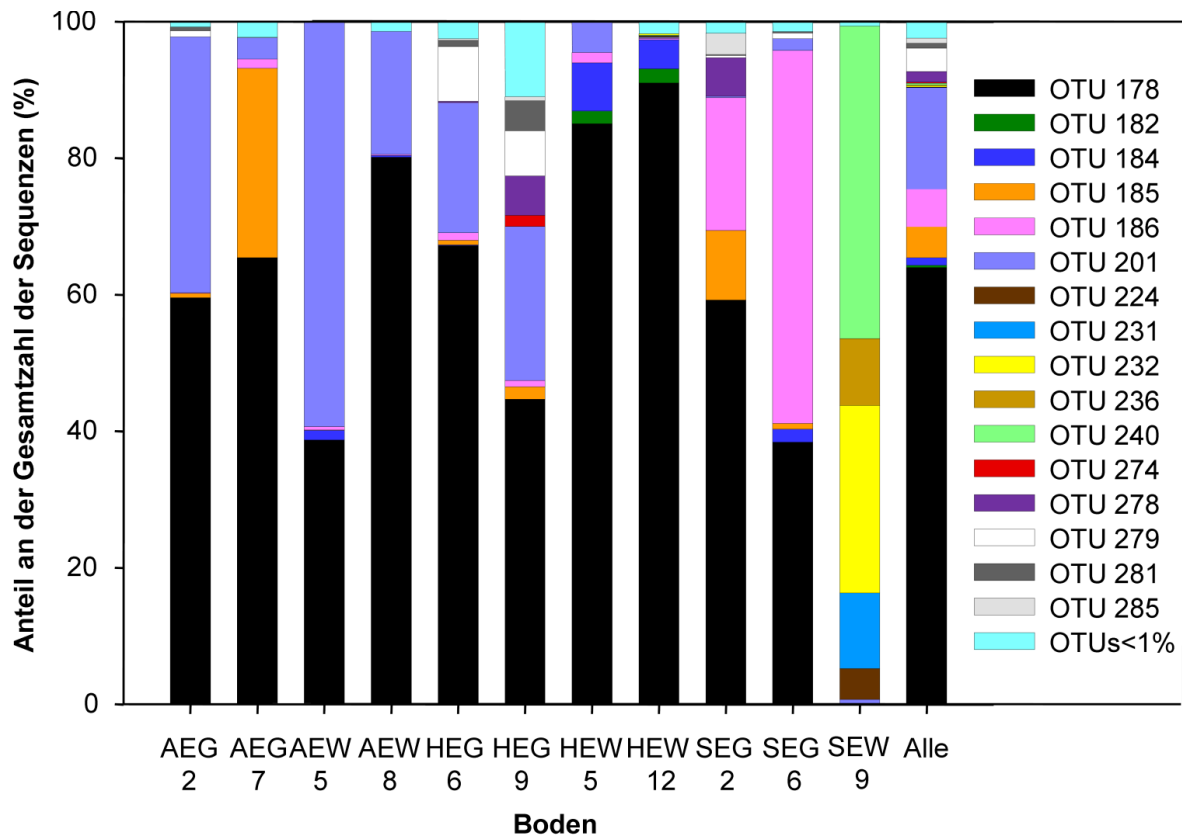


**Abb. 20:** CA des *mxoF*-Datensatzes. a, Aufnahmen in der DCA; b, Aufnahmen, Indikatoren und signifikant korrelierende Umweltparameter in der CCA; c, Häufigste OTUs und signifikant korrelierende Umweltparameter in der CCA; Kreise, Bodenproben; Kreuze, OTUs; Sterne, Indikatoren für Wald und Grünland; Dreiecke, nominale Umweltparameter; Pfeile, metrische Umweltparameter; Schwarze Symbole, Waldböden; Weiße Symbole, Grünlandböden;  $\lambda_1$ , Eigenwert der ersten Ordinationsachse;  $\lambda_2$ , Eigenwert der zweiten Ordinationsachse.

Indikatoren für Wälder waren OTU 6 (IV: 99,0%; P: 0,023) und OTU 15 (IV: 94,7%; P: 0,015). OTU 6 war verwandt zu *mxoF* einer *Methyloferula*-Spezies (Abb. 18). OTU 15 war entfernt verwandt zu einem *Bradyrhizobium*-Genotypen (Abb. 18). Ein Indikator für Grünland war OTU 2 (IV: 56,9%; P: 0,006). OTU 2 befand sich im MxoF-Stammbaum in der Nähe einer *Methylobacterium*-Sequenz (Abb. 18). Die Positionen der auf den Vektorpfeil projizierten Aufnahmen spiegelten die Reihenfolge der relativen pH-Werte wieder. HEW 12 hatte den niedrigsten pH-Wert und befand sich an der Basis des verlängerten Vektors. AEG 7 hatte den höchsten pH-Wert und befand sich an der Spitze des Vektors. Die Indikatoren für Wälder, OTU 6 und OTU 15, konnten mit Hilfe der Biplot-Regel in Beziehung zum pH-Wert gesetzt werden. Beide Indikatoren für Wälder bevorzugten einen eher sauren pH-Wert (Abb. 20 c). Ein OTU, das vermehrt bei hohen pH-Werten vorkam war OTU 7 (Abb. 20 c), zu dem 0,4% aller Sequenzen gehörten. OTU 7 verwandt zu *mxoF* einer *Methyloferula*-Spezies (Abb. 18).

### 3.3.6 Diversität von *mch*

Der *mch*-Datensatz enthielt vor der Rarefizierung mehr als 26.000 Sequenzen, die 70 verschiedenen OTUs zugeordnet wurden. Die geschätzte Anzahl der OTUs war etwas höher (Tab. 47). Die Genotypenzusammensetzung von SEW 9 war sehr verschieden zu der Genotypenzusammensetzung der anderen zehn Böden. In SEW 9 waren die Genotypen OTU 240, OTU 232 und OTU 231 dominant (Abb. 21), die verwandt waren zu *mch* von *Methyocella sylvestris* BL2 (71% Ähnlichkeit auf Aminosäurelevel; OTU 240), *Methyocella palustris* ORS2060 (76% Ähnlichkeit auf Aminosäurelevel; OTU 232) und *Starkeya novella* DSM 506 (72% auf Aminosäurelevel; OTU 231).



**Abb. 21:** Genotypenzusammensetzung von *mch* in den Böden der Exploratorien Schwäbische Alb (AEG 2, AEG 7, AEW 5, AEW 8), Hainich (HEG 6, HEG 9, HEW 5, HEW 12) und Schorfheide-Chorin (SEG 2, SEG 6, SEW 9). Basis für diese Darstellung war der nicht rarefizierte Datensatz.

Die Besonderheit von SEW 9 im Vergleich zu den anderen Böden zeigte sich auch in hohen Werten für Evenness und Shannon-Diversität (Tab. 47). Der Genmarker *mch* lieferte für den Boden SEW 9 die geringste Anzahl an Sequenzen und den kleinsten Wert für die Coverage innerhalb der Datensätze von *mxnA*, *mch* und *fae* (Tab. 47). Der *mch*-Datensatz für SEW 9 war damit eher nicht repräsentativ. Eine Rarefizierung auf 150 Sequenzen pro Boden, basierend auf der Anzahl an Sequenzen von SEW 9, dezimierte den *mch*-Datensatz stark. Die Rarefizierung erfolgte daher auch entsprechend der Anzahl der Sequenzen für SEG 6 (Tab. 47) auf 470 Sequenzen pro Boden. Auf diesem Datensatz basierend wurden dann Diversitätsindizes berechnet. Nach der Rarefizierung konnten 44 verschiedene OTUs identifiziert werden (Tab. 47). Der Shannon-Index und der Evenness-Index von HEW 12, berechnet für den rarefizierten Datensatz, waren geringer als die Indizes der anderen Böden (Tab. 47). Die höchste Shannon-Diversität und Evenness zeigte HEG 9 (Tab. 47). Alle OTUs, bis auf OTU 252, wurden zu drei Gruppen der *Alphaproteobacteria* zugeordnet (Abb. 12). Der häufigste *mch*-Genotyp, OTU 178 (Abb. 21), war nah verwandt zu GSC 1, dem Genotyp, der durch die Supplementation von Methanol in HEG 6 angeregt wurde (Abb. 12). Mehr als die Hälfte aller Sequenzen des Bodens HEG 6 gehörte zu diesem OTU.

OTU 178 war wie die anderen relativ abundanten Genotypen OTU 185 und OTU 186 (Abb. 21) entfernt verwandt zu *mch* von *Starkeya novella* DSM 506. OTU 201 war relativ dominant (Abb. 21) und entfernt verwandt zu *mch* von *Methylocella* (Abb. 12), einer Gattung, die wie *Starkeya*, zu den *Rhizobiales* gehört. OTU 252 war verwandt zu *mch* von *Betaproteobacteria* (Abb. 12). Dieses OTU zeigte lediglich eine geringe Abundanz (0,008% aller Sequenzen) und wurde nur im Boden SEG 2 nachgewiesen.

### 3.3.7 Korrelation der *mch*-Genotypenzusammensetzung mit Umweltparametern

Die multivariate Analyse des *mch*-Datensatzes erfolgte mittels CA und Monte Carlo Test (2.11.4), denn es lag keine Normalverteilung der Daten vor (Tab. 50). Die geringste Ausbeute an Sequenzen lieferte der Boden SEW 9 (Tab. 47). In einer ersten Analyse wurde der Datensatz auf 150 Sequenzen pro Boden rarefiziert. So konnten 11 verschiedene Böden in der CA verglichen werden. Die DCA ergab eine Gradientenlänge von 5,774 SD. pH-Wert, Vegetationstyp, Ammoniumkonzentration und gravimetrischer Wassergehalt korrelierten signifikant mit der *mch*-Genotypenzusammensetzung (Tab. 51). Die relativen hohen Trace-Werte ( $>0,5$ ) zeigten, dass ein hoher Anteil der Variabilität des *mch*-Datensatzes durch diese Parameter erklärt werden konnte.

**Tab. 50:** Ergebnisse des Normalverteilungstests nach Shapiro-Wilk für den *mch*-Datensatz, rarefiziert auf 470 Sequenzen pro Boden. Grau hervorgehobene Ansätze repräsentieren Daten, die nicht signifikant aus einer normalverteilten Grundgesamtheit gezogen wurden.

OTU	W
178	$3,132 \times 10^{-7}$
201	$1,223 \times 10^{-4}$
186	$3,361 \times 10^{-5}$
185	$4,059 \times 10^{-5}$
184	$1,692 \times 10^{-4}$
279	$1,252 \times 10^{-4}$
279	$5,221 \times 10^{-5}$
206	$1,507 \times 10^{-6}$
281	$3,912 \times 10^{-5}$
1825	$4,759 \times 10^{-5}$

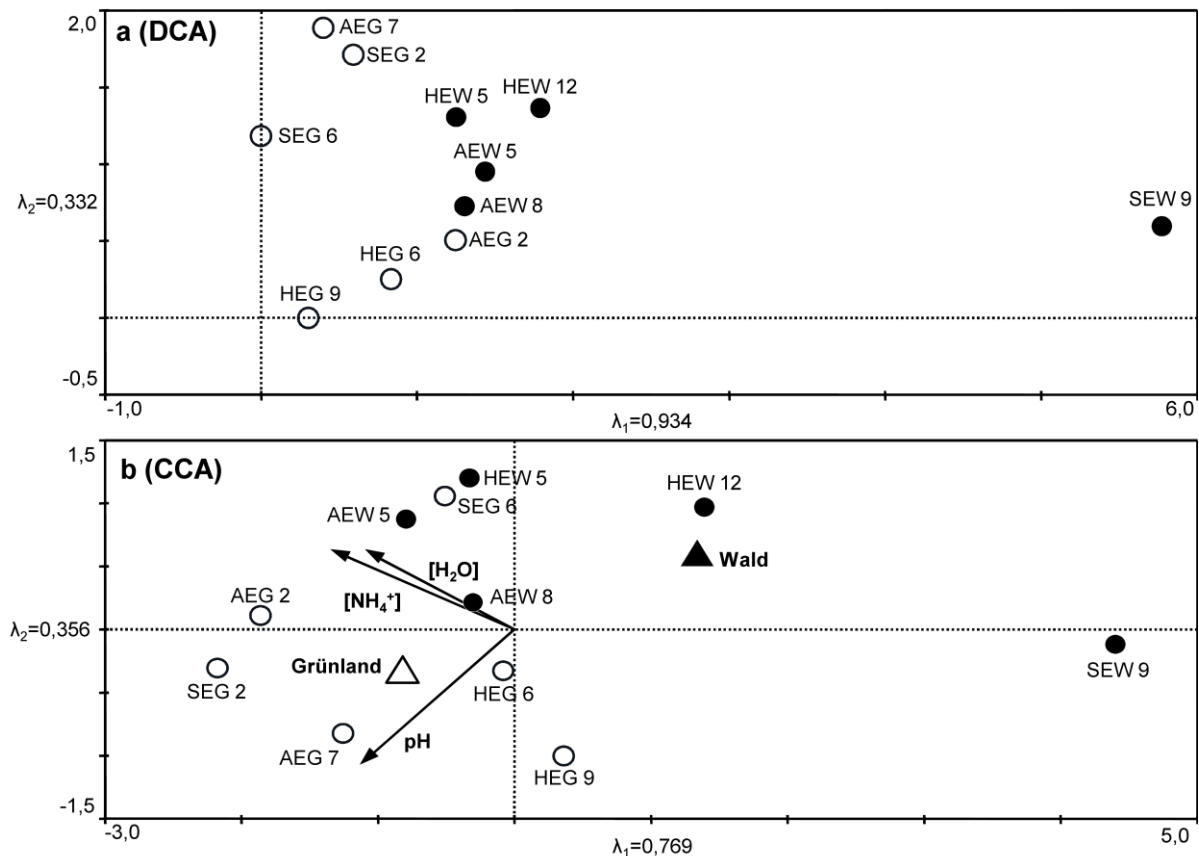
Abkürzungen: OTU, Operational Taxonomic Unit; W, Wahrscheinlichkeit.

**Tab. 51:** Ergebnisse des Monte Carlo Tests für den *mch*-Datensatz, rarefiziert auf 150 Sequenzen pro Boden und Umweltparameter. Grau hervorgehobene Umweltparameter zeigten eine signifikante Korrelation mit dem *mch*-Datensatz ( $P < 0,05$ ).

Umweltparameter	P	Trace
Vegetationstyp	0,0001	0,432
Landnutzungsintensität	0,8916	0,202
pH	0,0001	0,598
[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]	0,3890	0,267
[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ]	0,0264	0,663
[C]	0,2525	0,287
[N]	0,2305	0,296
[H <sub>2</sub> O]	0,0173	0,500

Abkürzungen: [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>], Nitratkonzentration; [NH<sub>4</sub><sup>+</sup>], Ammoniumkonzentration; [C], Gesamtkohlenstoffgehalt; [N], Gesamtstickstoffgehalt; [H<sub>2</sub>O], gravimetrischer Wassergehalt.

$\lambda_1$  und  $\lambda_2$  der CCA-Ordination waren kleiner als die der DCA-Ordination (Abb. 22). Die Eigenwerte der ersten Achsen der Ordinationsdiagramme der DCA und CCA lagen über 0,5. Es wurde eine hohe Variabilität durch die Ordinationsachsen dargestellt. Bei beiden Ordinationstypen war eine Trennung von Waldböden und Grünlandböden zu erkennen (Abb. 22), auch wenn diese Trennung bei der CCA-Ordination auf Grund der Position von SEG 6 nicht so deutlich war als wie bei der DCA-Ordination. Die Genotypenzusammensetzung der beiden Waldstandorte der Schwäbischen Alb unterschied sich von der Genotypenzusammensetzung der Wälder des Exploratoriums Hainich. Des Weiteren war die Genotypenzusammensetzung in Bodenproben von HEG 6 ähnlich zu der von HEG 9 (Abb. 21). Die relativen Positionen der anderen Aufnahmesymbole waren im DCA-Ordinationsdiagramm verschieden von denen der CCA-Ordination (Abb. 22). In dieser Analyse wurden folglich nicht alle Umweltparameter eingerechnet, die mit der *mch*-Genotypenzusammensetzung korrelierten.



**Abb. 22:** CA des *mch*-Datensatzes, rarefiziert auf 150 Sequenzen pro Boden. a, Aufnahmen in der DCA; b, Aufnahmen und signifikant korrelierende Umweltparameter in der CCA; Kreise, Bodenproben; Dreiecke, nominale Umweltparameter; Pfeile, metrische Umweltparameter; Schwarze Symbole, Waldböden; Weiße Symbole, Grünlandböden;  $\lambda_1$ , Eigenwert der ersten Ordinationsachse;  $\lambda_2$ , Eigenwert der zweiten Ordinationsachse.

Das Aufnahmesymbol von SEW 9 war sowohl im DCA- als auch im CCA-Ordinationsdiagramm von den anderen Aufnahmesymbolen separiert. Die erste Achse der CCA-Ordination war ausschlaggebend für die Sonderstellung von SEW 9. Die Genotypenzusammensetzung von SEW 9 unterschied sich stark von der Genotypenzusammensetzung der anderen Standorte (Abb. 21). SEW 9 war der Boden mit dem niedrigsten pH-Wert, der niedrigsten Ammoniumkonzentration und des niedrigsten gravimetrischen Wassergehalts (Tab. 39). Die Vektoren der Ammoniumkonzentration und des gravimetrischen Wassergehalts wiesen in dieselbe Richtung (Abb. 22). Die Ammoniumkonzentration und der gravimetrischer Wassergehalt korrelierten miteinander. Diese Korrelation wurde auch durch den Rangkorrelationstest nach Spearman (3.3.1) nachgewiesen. Die Länge des Vektors für die Ammoniumkonzentration relativ zur ersten Ordinationsachse war größer als die Vektorlänge des pH-Wertes und des gravimetrischen Wassergehaltes. Die Unterschiede der relativen Vektorlängen waren jedoch gering. Alle drei Vektoren trugen daher wesentlich zur ersten Ordinationsachse und damit zur Sonderstellung von SEW 9 bei (Abb. 22).

Der Stichprobenumfang von SEW 9 war gering im Vergleich zur Ausbeute der anderen Böden (Tab. 47). Um einen möglichst hohen Informationsgehalt der Daten zu erreichen, erfolgte in einer zweiten Analyse die Rarefizierung auf 470 Sequenzen pro Boden. Auf Grund dieser Rarefizierung gingen die Daten von SEW 9 nicht in die zweite Korrespondenzanalyse ein. Die Gradientenlänge war klein (2,611 SD). Umweltparameter, die mit der OTU-Zusammensetzung korrelierten, waren der *in situ* pH-Wert und der Vegetationstyp (Tab. 52).

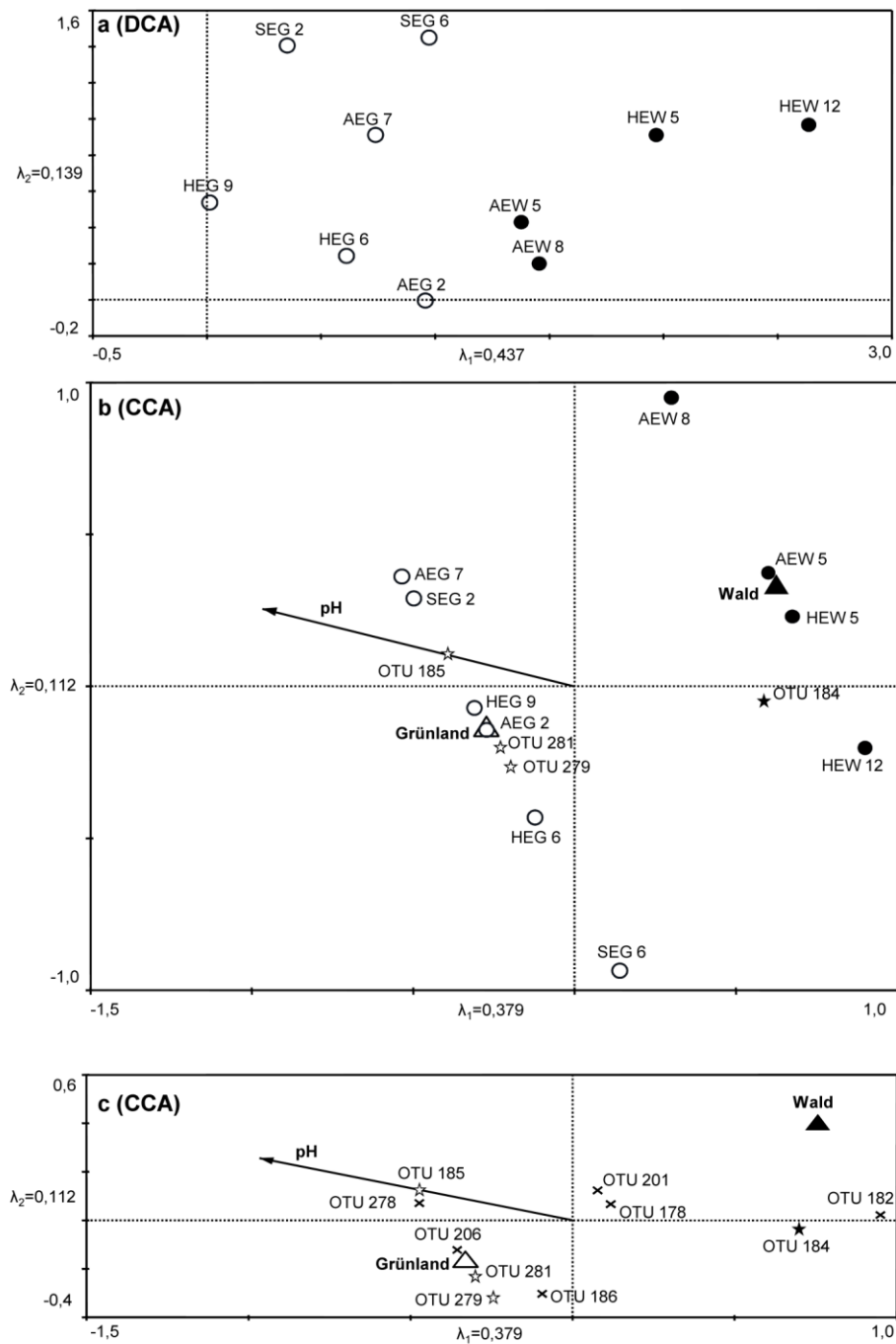
**Tab. 52:** Ergebnisse des Monte Carlo Tests für den *mch*-Datensatz, rarefiziert auf 470 Sequenzen pro Boden und Umweltparameter. Grau hervorgehobene Umweltparameter zeigten eine signifikante Korrelation mit dem *mch*-Datensatz ( $P < 0,05$ ).

Umweltparameter	P	Trace
Vegetationstyp	0,0001	0,322
Landnutzungsintensität	0,9652	0,094
pH	0,0005	0,361
[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]	0,3245	0,187
[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ]	0,1512	0,224
[C]	0,3583	0,194
[N]	0,2738	0,214
[H <sub>2</sub> O]	0,2157	0,207

Abkürzungen: [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>], Nitratkonzentration; [NH<sub>4</sub><sup>+</sup>], Ammoniumkonzentration; [C], Gesamtkohlenstoffgehalt; [N], Gesamtstickstoffgehalt; [H<sub>2</sub>O], gravimetrischer Wassergehalt.

$\lambda_1$  und  $\lambda_2$  der CCA-Ordination mit Biplotskalierung und Fokus auf die Artenbeziehung waren geringer als die der DCA-Ordination (Abb. 23). Die Eigenwerte lagen in beiden Fällen relativ nah an 0,5. Die Auftrennung der Arten entlang der Ordinationsachsen war relativ gut. Die Waldböden waren sowohl in der DCA- als auch in der CCA-Ordination separiert von den Grünlandböden. Insbesondere durch die DCA wurde die Ähnlichkeit der OTU-Zusammensetzung von AEW 5 und AEW 8 deutlich (Abb. 23). Die relativen Positionen der Grünlandböden unterschieden sich in der DCA- und CCA-Ordination. Es wurden nicht alle Umweltparameter detektiert, die mit der *mch*-Genotypenzusammensetzung korrelierten.





**Abb. 23:** CA des *mch*-Datensatzes, rarefiziert auf 470 Sequenzen pro Boden. a, Aufnahmen in der DCA; b, Aufnahmen, Indikatoren und signifikant korrelierende Umweltparameter in der CCA; c, Häufigste OTUs und signifikant korrelierende Umweltparameter in der CCA; Kreise, Bodenproben; Kreuze, OTUs; Sterne, Indikatoren für Wald und Grünland; Dreiecke, nominale Umweltparameter; Pfeile, metrische Umweltparameter; Schwarze Symbole, Waldböden; Weiße Symbole, Grünlandböden;  $\lambda_1$ , Eigenwert der ersten Ordinationsachse;  $\lambda_2$ , Eigenwert der zweiten Ordinationsachse.

Ein Indikator für Wälder war OTU 184 (IV: 90,0%; P: 0,025). OTU 185 (IV: 100%; P: 0,006), OTU 279 (IV: 83,3%; P: 0,042) und OTU 281 (IV: 83,3%; P: 0,047) waren Indikatoren für Grünländer. Die Indikatoren OTU 184 und 185 waren verwandt zu *mch* von *Starkeya*. Die Indikatoren OTU 279 und OTU 281 waren verwandt zu einem *Mesorhizobium*-Genotypen (Abb. 12). OTU 185 war nicht nur ein Indikator für Grünländer, sondern auch charakteristisch für Boden mit eher hohem pH-Wert (Abb. 23 c). OTU 184 war ein Indikator für Wälder und besonders häufig in Böden mit eher saurem pH-Wert (Abb. 23 c).

### 3.3.8 Diversität von *fae*

Der gefilterte *fae*-Datensatz enthielt 17.500 Sequenzen, die 63 verschiedenen OTUs zugeordnet wurden. Die geschätzte Anzahl der OTUs war etwas höher (Tab. 47). Der Shannon- und der Evenness-Index von SEW 9 waren kleiner als die Indizes der anderen Böden. Die größte Shannon-Diversität zeigte der nicht rarefizierte Datensatz von HEG 6 (Tab. 47). Basierend auf der Sequenzzahl von AEW 8 erfolgte die Rarefizierung auf 300 Sequenzen pro Boden. Durch die Rarefizierung reduzierte sich der Datensatz auf 44 OTUs, die in einen phylogenetischen Baum (Abb. 24) eingerechnet wurden. Der GenBank Datenbank wurde *fae*-Sequenzen entnommen, die für die fünf verschiedene Fae-Typen (Chistoserdova, 2011) kodierten und ebenfalls in den phylogenetischen Fae-Baum eingerechnet. Das Genom einiger Stämme, darunter *Methylobacterium extorquens* AM1, enthielt mehrere *fae*-Gene verschiedenen Typs. Die Fae1-, Fae2- und Fae3-Sequenzen von *Methylobacterium extorquens* AM1 hatten eine maximale Sequenzähnlichkeit von 35%. Alle detektierten OTUs gehörten zum Typ Fae1 (Abb. 24).

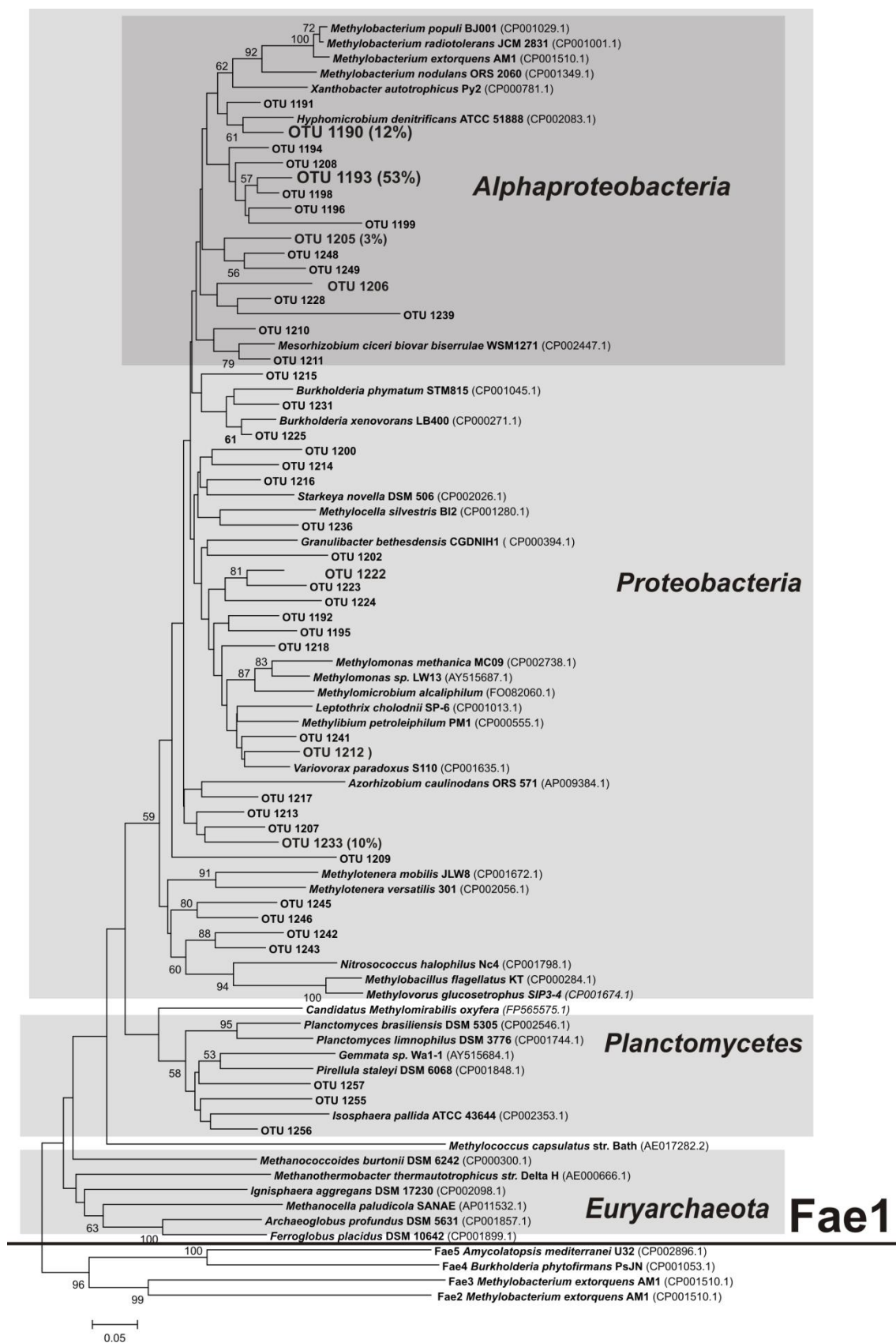
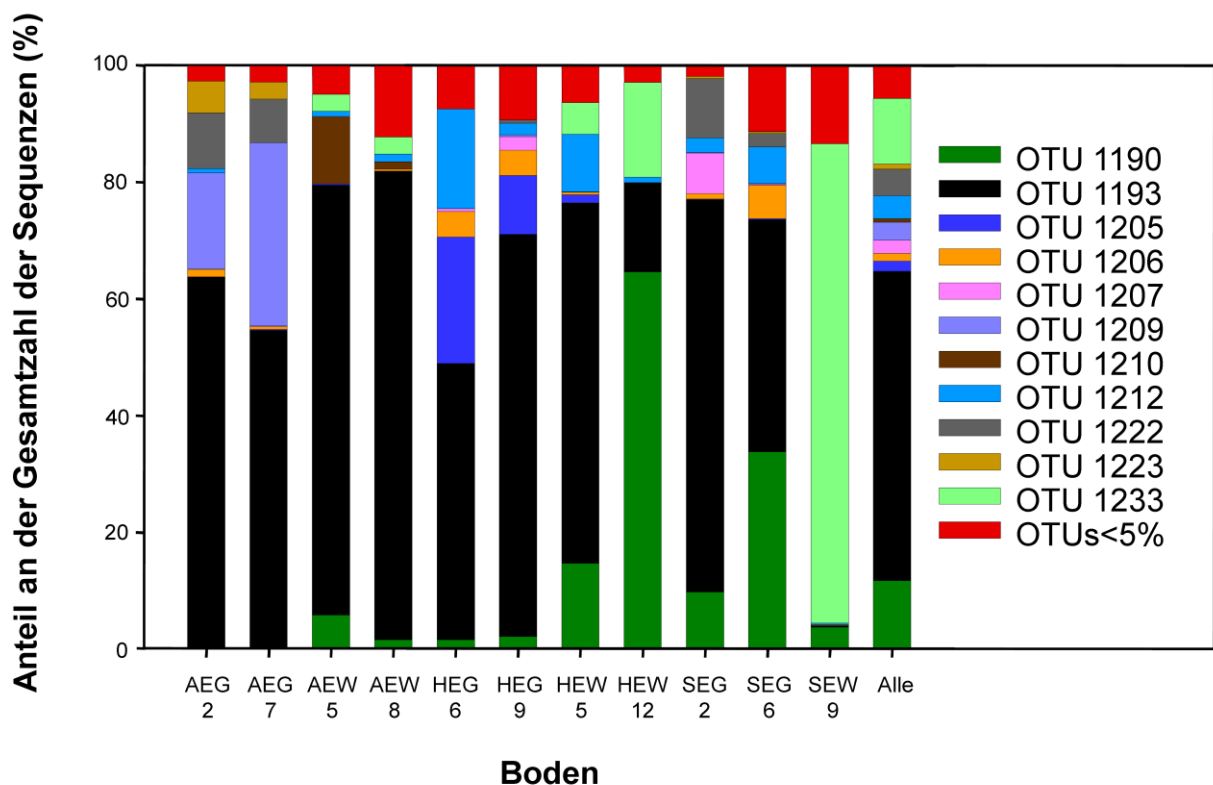


Abb. 24: Phylogenetischer Fae-Baum.

**Legende zu Abb. 24:** Phylogenetischer Fae-Baum. Der Cut-Off-Wert zur Differenzierung der OTUs war 80% (3.3.2). Es wurden alle OTUs des rarefizierten Datensatzes dargestellt. Hervorgehobene OTUs dominierten den Datensatz. Die Zahlenangaben in Klammern repräsentieren den prozentualen Anteil der jeweiligen OTU an der Gesamtzahl der Sequenzen. Die „Accession“-Nummern der *fae*-Sequenzen wurden in Klammern hinter den Artnamen gesetzt. Es wurden nur Bootstrap-Werte größer als 50% dargestellt.

OTU 1193 und OTU 1190 waren die beiden häufigsten Genotypen. Sie enthielten jeweils 53% und 12% aller *fae*-Sequenzen (Abb. 25). Beide OTUs wurden den *Alphaproteobacteria* zugeordnet (Abb. 24). Die OTUs 1257, 1255 und 1256 wurden den *Planctomycetes* zugeordnet (Abb. 24). Diese drei OTUs enthielten insgesamt weniger als 0,1% aller Sequenzen. Alle weiteren OTUs gehörten zu den *Proteobacteria*. Eine phylogenetische Zuordnung der OTUs zu isolierten Arten war nicht möglich, da in dieser Arbeit ein Datensatz-basierter Cut-Off-Wert und kein Spezieslevel Cut-Off-Wert zur Differenzierung der *fae*-OTUs angewandt wurde.



**Abb. 25:** Genotypenzusammensetzung von *fae* in den Böden der Exploratorien Schwäbische Alb (AEG 2, AEG 7, AEW 5, AEW 8), Hainich (HEG 6, HEG 9, HEW 5, HEW 12) und Schorfheide-Chorin (SEG 2, SEG 6, SEW 9). Basis für diese Darstellung war der nicht rarefizierte Datensatz.

Die Diversität von Boden SEW 9 unterschied sich stark von der Diversität der anderen Böden (Abb. 25). Der Shannon-Index und die Evenness von SEW 9 waren im Vergleich zu den anderen Böden am geringsten (Tab. 47). 82% aller Sequenzen von Boden SEW 9 wurden dem OTU 1233 zugeordnet (Abb. 24). Insgesamt gehörten jedoch nur 11% der Sequenzen aller Böden zu diesem Genotyp (Abb. 25). OTU 1233 gehörte zu den *Proteobacteria*, eine genauere phylogenetische Zuordnung war nicht möglich, da die *Proteobacteria* im phylogenetischen Fae-Baum nicht eindeutig in Klassen untergliedert waren.

### 3.3.9 Korrelation der *fae*-Genotypenzusammensetzung mit Umweltparametern

Die multivariate Analyse des *fae*-Datensatzes erfolgte mittels CA und Monte Carlo Test (2.11.4), denn der Shapiro-Wilk Test (2.11.2) ergab, dass meist keine Normalverteilung der Daten vorlag (Tab. 53). Die Gradientenlänge in der DCA betrug 3,820 und war damit eher lang. Vegetationstyp, pH und Nitratkonzentration korrelierten signifikant mit der *fae*-Genotypenzusammensetzung (Tab. 54).

**Tab. 53:** Ergebnisse des Normalverteilungstests nach Shapiro-Wilk für den *fae*-Datensatz. Grau hervorgehobene Ansätze repräsentieren Daten, die nicht signifikant aus einer normalverteilten Grundgesamtheit gezogen wurden

OTU	W
1193	$3,882 \times 10^{-2}$
1190	$8,504 \times 10^{-5}$
1233	$6,822 \times 10^{-6}$
1209	$1,992 \times 10^{-6}$
1212	$3,120 \times 10^{-3}$
1222	$8,449 \times 10^{-5}$
1202	$1,119 \times 10^{-5}$
1214	$3,339 \times 10^{-1}$
1206	$5,040 \times 10^{-3}$
1210	$6,739 \times 10^{-8}$

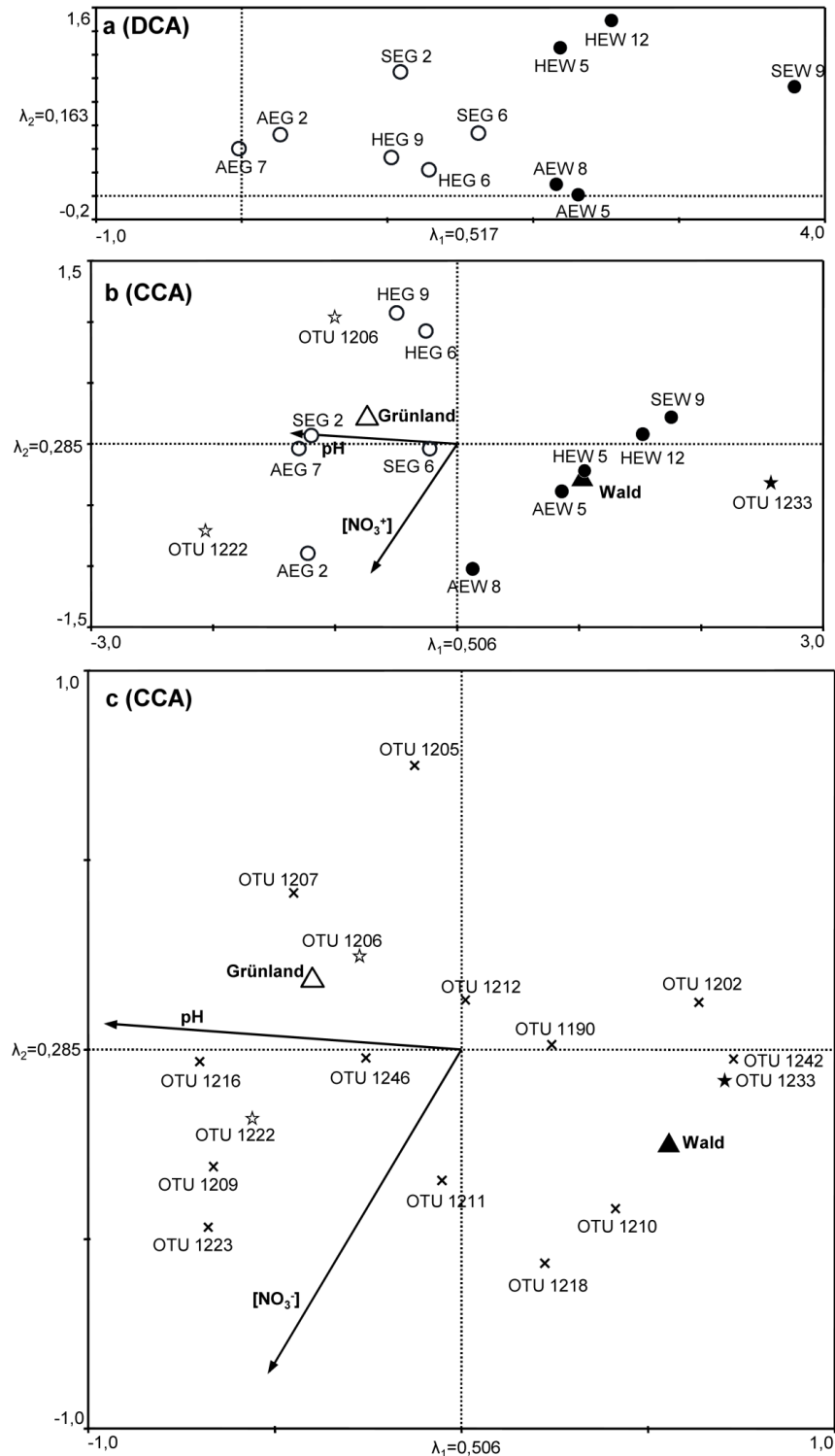
Abkürzungen: OTU, Operational Taxonomic Unit; W, Wahrscheinlichkeit.

**Tab. 54:** Ergebnisse des Monte Carlo Tests für den *fae*-Datensatz und Umweltparameter. Grau hervorgehobene Umweltparameter zeigten eine signifikante Korrelation mit dem *fae*-Datensatz ( $P > 0,05$ ).

Umweltparameter	P	Trace
Vegetationstyp	0,0018	0,433
Landnutzungsintensität	0,9250	0,137
pH	0,0005	0,470
[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]	0,0390	0,341
[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ]	0,1014	0,325
[C]	0,7120	0,160
[N]	0,7325	0,161
[H <sub>2</sub> O]	0,3304	0,239

Abkürzungen: [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>], Nitratkonzentration; [NH<sub>4</sub><sup>+</sup>], Ammoniumkonzentration; [C], Gesamtkohlenstoffgehalt; [N], Gesamtstickstoffgehalt; [H<sub>2</sub>O], gravimetrischer Wassergehalt.

Auf Grund des eher langen Gradienten wurde zur Herstellung eines CCA-Ordinationsdiagramms die Hillskalierung gewählt. Der Fokus lag auf der Aufnahmebeziehung. Die Eigenwerte der Ordinationsachsen der DCA und der CCA waren zueinander relativ ähnlich. Die Eigenwerte der ersten Achsen in der DCA und CCA waren größer als 0,5. Die Auftrennung der Artwerte entlang der ersten Achsen war gut. Sowohl im DCA-Ordinationsdiagramm als CCA-Ordinationsdiagramm wurde eine klare Trennung der Aufnahmepunkte der Grünlandböden von denen der Waldböden sichtbar. Insbesondere in der DCA wurde die Ähnlichkeit der Genotypenzusammensetzung der Waldböden und Grünlandböden innerhalb eines Exploratoriums zueinander deutlich (Abb. 26 a). Sowohl in der DCA als auch in der CCA lag der Aufnahmepunkt für SEW 9 abseits der anderen Aufnahmepunkte (Abb. 26). Dies sprach dafür, dass in die CCA alle Umweltparameter eingerechnet wurden, die signifikant mit der Genotypenzusammensetzung korrelierten. Die Vektoren für pH-Wert und Nitratkonzentration wiesen in verschiedene Richtungen. Die beiden Umweltparameter korrelierten nicht miteinander. Dies wurde bereits durch den Rangkorrelationstest nach Spearman gezeigt (3.3.1). Durch Fällen des Lotes von der jeweiligen Vektorspitze und Vektorbasis auf die Ordinationsachse wurde die relative Vektorlänge bestimmt. Die erste Ordinationsachse war stärker vom pH-Wert als von der Nitratkonzentration beeinflusst. Die zweite Ordinationsachse war stärker von der Nitratkonzentration als vom pH-Wert bestimmt (Abb. 26). Beide Parameter waren bestimmend für die Sonderstellung von SEW 9.



**Abb. 26:** CA des *fae*-Datensatzes. a, Aufnahmen in der DCA; b, Aufnahmen, Indikatoren und signifikant korrelierende Umweltparameter in der CCA; c, Häufigste OTUs und signifikant korrelierende Umweltparameter in der CCA; Kreise, Bodenproben; Kreuze, OTUs; Sterne, Indikatoren für Wald und Grünland; Dreiecke, nominale Umweltparameter; Pfeile, metrische Umweltparameter; Schwarze Symbole, Waldböden; Weiße Symbole, Grünlandböden;  $\lambda_1$ , Eigenwert der ersten Ordinationsachse;  $\lambda_2$ , Eigenwert der zweiten Ordinationsachse.

Indikatoren für Grünländer waren OTU 1206 (IV: 97,7%; P: 0,004) und OTU 1222 (IV: 83,3%; P: 0,014). Ein Indikator für Wälder war OTU 1233 (IV: 100; P: 0,002). Alle drei Indikator-Genotypen waren verwandt zu *Alphaproteobacteria* (Abb. 24). OTU 1205 bevorzugte Böden mit niedriger Nitratkonzentration (Abb. 26 c). OTU 1223 Böden war in Böden mit eher hoher Nitratkonzentration abundant (Abb. 26 c).

### 3.3.10 Reinkulturen

Insgesamt wurden 129 Reinkulturen von neun verschiedenen Böden auf Medium mit Methanol als Kohlenstoffquelle gewonnen (Tab. A im Anhang). Die Isolierung von Reinkulturen wurde durch ein starkes Wachstum von Pilzmyzelien auf den Agarplatten erschwert. Auch die Zugabe von Nystatin (2.7.1) konnte das Pilzwachstum nicht vollständig eindämmen.

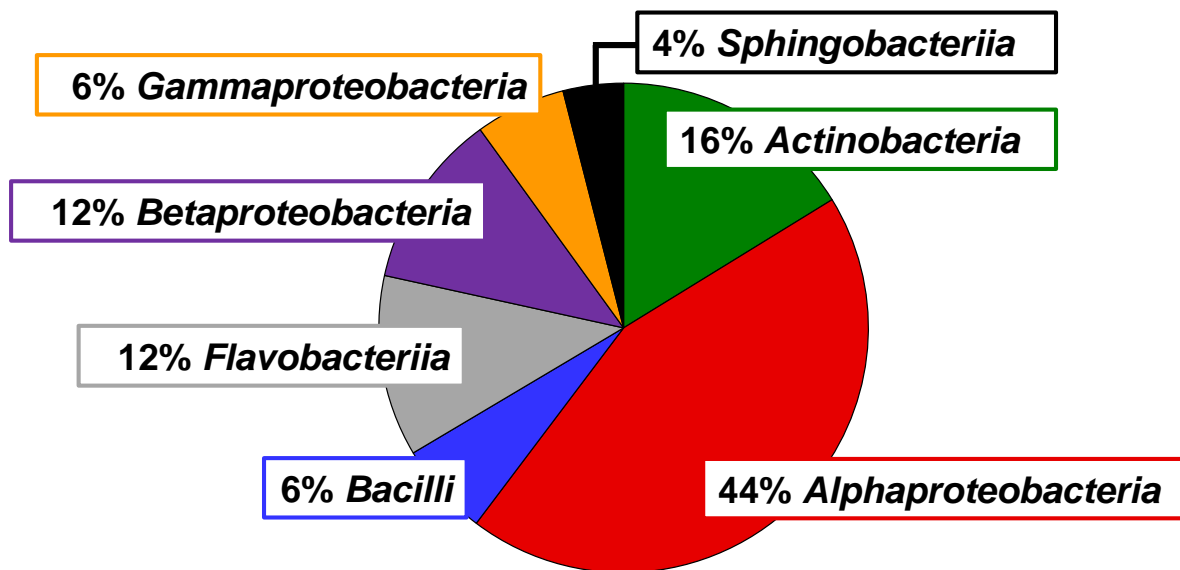
Die Analyse von Teilsequenzen der 16S rRNA Gene der Reinkulturen diente zur taxonomischen Eingliederung der Isolate. Mischkulturen könnten die Bildung von Sequenzchimären während der PCR zur Folge haben. Eine Bildung derartiger Chimären wurde für die in dieser Doktorarbeit gewonnenen Isolate ausgeschlossen (2.8.8).

Ein Großteil der 16S rRNA Sequenzen der Reinkulturen (93%) war nah verwandt (mehr als 97% Sequenzidentität) mit Sequenzen von bekannten Arten (Tab. A im Anhang). Die 16S rRNA Sequenzen der Reinkultur 48 und der Reinkultur 63 waren hingegen entfernt verwandt zu Sequenzen von bekannten Arten (weniger als 93% Sequenzidentität).

Vier Reinkulturen wurden durch den Isolierungsansatz E (2.7.2, Tab. 19) auf saurem Medium gewonnen. Alle anderen Reinkulturen wurden auf neutralem Medium angereichert (Tab. A im Anhang). Die Ansätze F, G und H (Tab. 19) lieferten keine Reinkulturen.

62% der Reinkulturen wurden den *Proteobacteria* zugeordnet. Ein Großteil der Reinkulturen gehörte zu den *Alphaproteobacteria*, aber auch *Beta*- und *Gammaproteobacteria* wurden isoliert. Des Weiteren wurden Vertreter der *Actinobacteria* und *Flavobacteriia* in Reinkultur gebracht. Nur wenige Reinkulturen wurden den *Bacilli* und *Sphingobacteriia* zugeordnet (Abb. 27).





**Abb. 27:** Taxonomische Einordnung der Reinkulturen in Klassen.

Die Reinkulturen gehörten 34 verschiedenen Gattungen an (Tab. A im Anhang). Die häufigsten Gattungen waren *Bradyrhizobium* (23 Reinkulturen) und *Flavobacterium* (16 Reinkulturen). Aber auch Reinkulturen der Gattungen *Burkholderia* (neun Reinkulturen), *Mycobacterium* (sieben Reinkulturen) und *Pseudomonas* (sieben Reinkulturen) wurden häufig isoliert. Einigen Gattungen wie z.B. *Microbacterium* oder *Herbaspirillum* wurde lediglich je eine einzige Reinkultur zugeordnet (Tab. A im Anhang).

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Oxidation von *in situ* relevanten Methanolkonzentrationen durch methylo trope *Bacteria* in Grünlandböden

Terrestrische Ökosysteme sind eine wichtige Senke von Methanol im globalen Methanolhaushalt (Galbally und Kristine, 2002; Jacob *et al.*, 2005). Es ist bereits bekannt, dass Methanol-oxidierende Methylo trope im Boden durch Methanolkonzentrationen im Bereich einiger mmol Methanol pro Gramm Frischgewicht des Bodens stimuliert werden (Radajewski *et al.*, 2002). Die *in situ* Konzentration von Methanol in Böden wurde aufgrund von fehlenden geeigneten analytischen Methoden bis heute nicht gemessen (1.5), sie ist jedoch wahrscheinlich deutlich geringer als ein mmol pro g Frischgewicht des Bodens (Conrad und Claus, 2005; Kolb, 2009 a). Wichtige Methanolquellen in oxischen Böden sind die atmosphärische Deposition und unterirdische Pflanzenteile (Galbally und Kristine, 2002). Basierend auf der maximalen atmosphärischen Methanolkonzentration (10 ppb) (Galbally und Kristine, 2002; Jacob *et al.*, 2005) kann geschätzt werden, dass die Diffusion von atmosphärischem Methanol in den Boden zu einer maximalen Methanolkonzentration von etwa 0,02  $\mu\text{mol}$  Methanol pro g Trockengewicht des Bodens führt. Informationen darüber, wie viel Methanol von unterirdischen Pflanzenteilen in den umgebenden Boden abgegeben wird, existieren nicht.

In dieser Doktorarbeit wurden Bodenproben aus dem Fichtelgebirge (FG), dem Nationalpark Hainich (HEG 6) und dem Garten des Instituts für Ökologische Mikrobiologie der Universität Bayreuth (OG) (2.1) mit radiochemischen Methoden hinsichtlich einer Oxidationsaktivität bei *in situ* relevanten Methanolkonzentrationen untersucht. Die geringste Methanolkonzentration, bei der eine Oxidationsaktivität der Boden-aufschlammungen nachgewiesen wurde (0,002  $\mu\text{mol}$  Methanol pro g Trockengewicht für den Boden HEG 6; entspricht 0,05  $\mu\text{M}$ ), lag unterhalb von 0,02  $\mu\text{mol}$  Methanol pro g Trockengewicht Boden (3.2.1). Damit wurde in dieser Doktorarbeit erstmals gezeigt, dass oxische Böden das Potential haben, atmosphärisches Methanol zu oxidieren. Es wurden keine Lag-Phasen beim Abbau von Methanol beobachtet, was darauf hinweist, dass Methanol-oxidierende Mikroorganismen in den untersuchten Böden an derart niedrige Methanolkonzentrationen angepasst waren.

Die TRFLP-Analyse von *mch* aus Aufschlammungen von HEG 6 führte zur Identifizierung von *mch*-Genotypen, die durch *in situ* relevante Methanolkonzentrationen stimuliert wurden (3.2.3, Abb. 11). Methylo trope *Bacteria* spielten folglich eine wesentliche Rolle bei der Methanoloxydation in den Bodenaufschlammungen von HEG 6 (Hypothese 1, 1.10 ). GSC 1 und GSC 2 waren entfernt verwandt zu *mch*-Genotypen von bekannten Methylo trophen (3.2.3, Abb. 12). GSC 1- und GSC 2-ähnliche Genotypen wurden sowohl in Grünländern als auch in Wäldern nachgewiesen. GSC 1 und GSC 2 zeigten eine Verwandtschaft zu den *mch*-Genotypen von *Alphaproteobacteria* (3.2.3, Abb. 12). Die Analyse der *mch*-Diversität von 11 weiteren Böden mittels Pyrosequenzierung ergab, dass *Alphaproteobacteria* das häufigste Phylum war (3.3.6). *Alphaproteobacteria* spielen daher wahrscheinlich eine

entscheidende Rolle bei der Oxidation von atmosphärischem Methanol in Grünlandböden (4.3.1).

Es sind bislang keine methylo trophen Isolate bekannt, die bei 0,05  $\mu\text{M}$  Methanol aktiv sind. Methanol-oxidierende Mikroorganismen aus Böden werden in der Regel in Medium mit Methanolkonzentrationen im millimolaren Bereich isoliert (z.B. Boden *et al.*, 2008; Dedysh *et al.*, 2004 a). Diese Kultivierungsbedingungen führen vor allem zur Anreicherung von Methanol-oxidierenden *Bacteria*, die ihr Wachstums optimum im millimolaren Bereich haben. Kultivierungsversuche von oligotrophen *Bacteria* führten im Jahr 2008 zur Isolierung des marinen Stammes HTCC2181 (Giovannoni *et al.*, 2008), der auch bei suboptimalen Methanolkonzentrationen (d.h. 10  $\mu\text{M}$  Methanol) hohe Wachstumsraten zeigte, sofern im Medium zusätzliche C1-Substrate wie z.B. Dimethylamin enthalten waren (Halsey *et al.*, 2012). Unter diesen Kultivierungsbedingungen wird Methanol vorwiegend assimiliert, während die zusätzlichen C1-Substrate als Energiequellen dienen (Halsey *et al.*, 2012). Die minimale Methanolkonzentration, die von methylo trophen Isolaten genutzt wird, kann folglich vom Vorhandensein alternativer Substrate in der Umgebung abhängen. Basierend auf der Literatur sind Rückschlüsse auf methylo trope Arten, die in den Bodenaufschlammungen bei *in situ* relevanten Methanolkonzentrationen aktiv waren, derzeit insgesamt nicht möglich.

In der festen und flüssigen Phase der Aufschlammungen wurde ein geringerer Anteil der eingesetzten Radioaktivität wiedergefunden als in Form von  $\text{CO}_2$  (3.2.2, Abb. 10). Die Radioaktivität in der festen und flüssigen Phase resultierte aus nicht verwertetem  $^{14}\text{C}$ -Methanol und assimiliertem  $^{14}\text{C}$ -Methanol. In den Bodenaufschlammungen FG und HEG 6 wurde folglich mehr Methanol dissimiliert als assimiliert. Auch für Meerwasser wurde gezeigt, dass Methanolkonzentrationen im nanomolaren Bereich vor allem als Energiequelle genutzt werden und insgesamt weniger Methanol als Kohlenstoffquelle inkorporiert wird (Dixon *et al.*, 2011). Methanolkonzentrationen im nanomolaren Bereich sind folglich ausreichend, um methylo trope Zellen im Boden und im Meerwasser am Leben zu erhalten und einige methylo trope Gruppen zum Wachstum anzuregen (Abb. 11).

In dieser Doktorarbeit ist es erstmals gelungen, apparente Michaelis-Menten-Parameter der Methanoloxidation für oxische Böden zu bestimmen (Tab. 42). In Böden befinden sich verschiedene Methanol-oxidierende Arten, die sich in ihren Methanol-oxidierenden Enzymen unterscheiden können. In dieser Doktorarbeit wurden aus dem Boden SEW 9 Reinkulturen auf Methanol-haltigem Medium isoliert, die den Gattungen *Hyphomicrobium* und *Bacillus* zugeordnet wurden. Die PQQ-abhängige MDH von *Hyphomicrobium denitrificans* hat eine deutlich geringere Methanolaффinität ( $K_m = 3 - 10 \mu\text{M}$ ; Nojiri *et al.*, 2006) als die NAD(P)-bindende MDH von *Bacillus methanolicus* ( $K_m > 200 \mu\text{M}$ ; Arfman *et al.*, 1989; Hektor *et al.*, 2002). Die enzymatische Aktivität, die in dieser Doktorarbeit bestimmt wurde, setzt sich aus den Aktivitäten der in Böden vorhandenen Methanoldehydrogenasen zusammen und wird daher als apparent bezeichnet (Tate, 1995). In der direkten Auftragung der Dissimilationsraten gegen die Substratkonzentration von FG befand sich der Wert der Dissimilationsrate bei der höchsten Substratkonzentration außerhalb der

Hyperbel-Kurve (3.2.1, Abb. 9). Möglicherweise folgte die Methanoldissimilation im Boden FG einer biphasischen Kinetik, was wiederum das Resultat von unterschiedlichen Affinitäten der in den Böden vorhandenen Methanoldehydrogenasen sein könnte. Multiphasische Kinetiken sind ein bekanntes Phänomen bei der Bestimmung von enzymatischen Aktivitäten und wurden bereits für die Assimilation von Methanol in Meerwasser (Dixon *et al.*, 2011) und die Methanoxidation durch Methanotrophe in Böden nachgewiesen (Steenbergh *et al.*, 2010).

Neben bakteriellen Methanoldehydrogenasen könnten andere Enzyme und darüber hinaus abiotische Prozesse (z.B. die photochemische Oxidation) an der Methanoloxidation in den Aufschlammungen beteiligt gewesen sein. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Alkohol-Oxidasen von methylotrophen Pilzen in den Bodenaufschlammungen aktiv waren. Einige Hefen wie z.B. *Candida boidinii* (Volfová, 1975) oder *Hansenula polymorpha* (Jones und Bellion, 1991) sind in der Lage, Methanol zu nutzen. Beim Abbau von Methanol durch Pilze wird Methanol in Peroxisomen mit Hilfe einer Alkohol-Oxidase zu Formaldehyd oxidiert (Jones und Bellion, 1991). Im dissimilatorischen Weg reagiert Formaldehyd im Cytosol mit Glutathion und wird in zwei weiteren Schritten zu CO<sub>2</sub> oxidiert. Im assimilatorischen Weg kondensiert Formaldehyd im Peroxisom mit Xylulose-5-phosphat und es entstehen infolge Dihydroxyaceton und Glycerinaldehyd-3-Phosphat, die im Cytosol weiter metabolisiert werden (Hartner und Glieder, 2006). Der Pilz, der in Ansätzen mit *Arabidopsis thaliana* wuchs, ernährte sich jedoch nicht von Methanol, denn die Pilzkultur zeigte eine sehr geringe Methanoloxidationsaktivität (3.2.1, Abb. 7). Die Pilzkultur nutzte möglicherweise organisches Material, das von Pflanzengewebe abgegeben wurde und bei der Inokulation in frische Saline übertragen wurde.

Eine weitere potenzielle biologische Methanolsenke in terrestrischen Ökosystemen ist Pflanzenmaterial (Galbally und Kristine, 2002; Cossins, 1964). Im Jahr 1964 wurde durch Versuche mit <sup>14</sup>C-Methanol gezeigt, dass pflanzliches Gewebe die Fähigkeit hat, Methanolkonzentrationen im mikromolaren Bereich zu metabolisieren. In Speichergewebe von Karotten wurden 67% des zur Verfügung gestellten Methanols durch Dehydrogenasen innerhalb von vier Stunden zu CO<sub>2</sub> oxidiert. Des Weiteren wurden etwa 2,8% des radioaktiv markierten Kohlenstoffs in Aminosäuren wie Serin und Methionin nachgewiesen (Cossins, 1964). Die geringe Oxidationsaktivität in Inkubationsversuchen mit gewaschenen Wurzeln oder unter sterilen Bedingungen gezüchteter *Arabidopsis thaliana* legt nahe, dass Methanol-oxidierende Dehydrogenasen in Pflanzengewebe eine untergeordnete Rolle bei der Methanoloxidation in den Bodenaufschlammungen spielten (3.2.1, Abb. 7).

Auch Ethanoldehydrogenasen von *Bacteria* können Methanol oxidieren und kommen in oxischen Böden vor. Die Affinität von Ethanoldehydrogenasen für Methanol (z.B. für *Pseudomonas aeruginosa*  $K_m = 94$  mM) ist jedoch im Vergleich zur Affinität für Ethanol (z.B. für *Pseudomonas aeruginosa*  $K_m = 14$  µM) gering (Rupp und Görisch, 1988). Es ist daher unwahrscheinlich, dass die Aktivität von Ethanoldehydrogenasen einen

entscheidenden Beitrag zur Oxidation von *in situ* relevanten Methanolkonzentrationen in den Aufschlammungen lieferte.

Aufschlammungen von HEG 6 und OG mit Cyanid zeigten ein deutlich reduziertes Oxidationspotenzial von Methanol (3.2.1, Abb. 7). Die abiotische Oxidation von Methanol spielte in den Aufschlammungen folglich eine untergeordnete Rolle. In Bodenaufschlammungen von FG hatte Cyanid lediglich einen geringen Effekt auf die Oxidation von Methanol (3.2.1, Abb. 7). Möglicherweise bildeten die Cyanid-Ionen in FG Komplexe mit Schwermetallen wie Eisen oder Mangan und präzipitierten (Chatwin, 1989; Lagas *et al.*, 1982).

Apparente kinetische Parameter können durch viele Faktoren (z.B. Substratadsorption, inhibitorische und aktivierende Substanzen, Enzymkonzentration, Diffusionslimitierung) beeinflusst werden (Tate, 1995). So erhöht z.B. Trimethylamin die Methanoloxidationsraten in oberflächennahen Meerwasser. Dieser Effekt beruht wahrscheinlich auf einer Induktion von Enzymen des C1-Stoffwechsels der Methyloprophen im Meerwasser (Dixon *et al.*, 2011).  $a_s^0$ -Werte sind von solchen Faktoren unabhängig und eignen sich zum Vergleich der enzymatischen Aktivität in verschiedenen Ökosystemen. Die hohen  $K_m$ -Werte von HEG 6 im Vergleich zu denen von FG lassen sich möglicherweise durch eine Diffusionslimitierung in Aufschlammungen von HEG 6 erklären, da die Bodenaufschlammungen während der Inkubationszeit nicht durchgehend geschüttelt wurden.  $a_s^0$ -Werte sind unabhängig von einer solchen Diffusionslimitierung und im Falle von FG und HEG 6 zueinander ähnlich (3.2.1, Tab. 42), was darauf hindeutet, dass verschiedene Grünlandböden eine ähnliche Affinität zu Methanol haben. Weitere Studien zur Bestimmung der apparenten Michaelis-Menten-Parameter der Methanoloxidation in Proben von oxischen Böden existieren derzeit nicht. Die in dieser Doktorarbeit bestimmten  $v_{max}$ -Werte (3.2.1) waren ähnlich zu den Abbauraten von Methanol in Aufschlammungen von Bodenproben aus bis zu 1 m Tiefe (0,04 bis 0,1 mM d<sup>-1</sup>; Hickman und Novak, 1989) und Bodenproben eines oxischen Grundwassersystems (0,09 mM d<sup>-1</sup>; White *et al.*, 1986), was wiederum darauf schließen lässt, dass sich verschiedene Böden hinsichtlich ihrer Methanoloxidationsaktivität ähneln. Dieser Vergleich muss jedoch kritisch betrachtet werden, da  $v_{max}$ -Werte zur Enzymmenge im Ansatz proportional sind (Tate, 1995) und keine Informationen über die Menge an Methanoldehydrogenasen in den Versuchsansätzen dieser Doktorarbeit und den Ansätzen von Hickman und Novak oder White existieren.

Die  $a_s^0$ -Werte für die Oxidation von Methanol der hier untersuchten oxischen Böden (3.2.1, Tab. 42) sind niedriger als die  $a_s^0$ -Werte für den Methanolabbau in Meerwasser (0,28 und 3,10 d<sup>-1</sup>; Dixon *et al.*, 2011). Die Affinität der Grünlandböden FG und HEG 6 für Methanol ist folglich geringer als die Affinität von Meerwasser. Dies weist darauf hin, dass Methanol-oxidierende Systeme in Böden anders gestaltet sind als in marinen Systemen, obwohl die Methanolkonzentration in der oberen Ozeanschicht (0,1-0,6 µM; Galbally und Kristine, 2002) vergleichbar ist mit der geschätzten Methanolkonzentration in Böden (Conrad und Claus, 2005; Kolb, 2009 a).

## 4.2 Umweltparameter, die mit den Zellzahlen von potenziellen Methyлотроphen und der Genotypenzusammensetzung von *mx**aF*, *mch* und *fae* korrelierten

Mehrere Bodenparameter korrelierten mit der Gemeinschaftsstruktur der Methyлотроphen in oxischen Böden (1.10, Ziel 4). Durch die MPN- und Genmarker-basierten Analysen wurde ein Einfluss des Vegetationstyps auf die Gemeinschaft der Methyлотроphen nachgewiesen. Die Anordnung der Symbole im CCA-Ordinationsdiagramm des MPN-Datensatzes (3.3.1, Abb. 13) verdeutlichte, dass die Waldböden hinsichtlich der Zellzahlen verschieden von den Grünlandböden waren, auch wenn kein signifikanter Zusammenhang zwischen den MPN-Daten und dem Vegetationstyp nachgewiesen wurde (3.3.1, Tab. 46). Die Diversität der *mx**aF*-, *mch*- und *fae*-Genotypen korrelierte mit dem Vegetationstyp (3.3.5, 3.3.7, 3.3.9) (Hypothese 4, 1.10). Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen einer Studie an methanotrophen Methyлотроphen überein, die ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der Diversität und dem Vegetationstyp aufgedeckte. Mittels Klonierung und Fingerprintmethoden wurde die Diversität eines funktionellen Gens von Methanotrophen (*pmoA*, 1.9) im Boden eines Kiefernwaldes, einer Steppe und einer Weide analysiert. Typ II Methanotrophe waren im Boden des Kiefernwaldes und der Steppe dominant, während Typ I Methanotrophe im Boden der Weide dominierten (Singh *et al.*, 2007). In einer Studie an Böden der Schwäbischen Alb wurde gezeigt, dass der Vegetationstyp mit der bakteriellen 16S rRNA Gendiversität korrelierte. Wald- und Grünlandböden unterschieden sich hinsichtlich der relativen Häufigkeit wichtiger bakterieller Taxa (Nacke *et al.*, 2011). In Waldböden waren *Alphaproteobacteria* dominant, in Grünlandböden hingegen *Actinobacteria* (Nacke *et al.*, 2011). Des Weiteren ist bekannt, dass der Vegetationstyp in den Böden der drei Exploratorien Schwäbische Alb, Hainich und Schorfheide-Chorin eine andere mikrobielle Großgruppe, die *Acidobacteria*, beeinflusst (Naether *et al.*, 2012). Der Vegetationstyp hat daher nicht nur einen Einfluss auf Methyлотrophe, sondern kann für die mikrobielle Gemeinschaft in Böden ganz allgemein bestimmend sein.

Der Vegetationstyp setzt sich aus mehreren Faktoren zusammen, die die Gemeinschaft der Methyлотроphen im Boden direkt beeinflussen könnten. Der ausschlaggebende Faktor für die Korrelation der Diversität der Methyлотроphen mit dem Vegetationstyp könnte die unterschiedliche Artenzusammensetzung der Pflanzen in den Grünländern und Wäldern sein (1.8.8). Dem entsprechend wurde für methanotrophe Methyлотrophe in Waldböden bereits gezeigt, dass die Genotypenzusammensetzung von der Baumart abhängt (Kolb, 2009 b). Methyлотrophe *Bacteria* können Wechselbeziehungen mit Pflanzen eingehen, die sehr eng sind wie z.B. die Interaktion des diazotrophen Wurzelknöllchenbakteriums *Methylobacterium nodulans* mit *Crotalaria podocarpa* (Jourand *et al.*, 2005) und so durch die Anwesenheit bestimmter Pflanzenarten (z.B. *Crotalaria*) gefördert werden (1.8.8). Einige *Crotalaria*-Arten produzieren methylierte Toxine (z.B. Pyrolizidin-Alkaloide), die von *Methylobacterium nodulans* durch methyлотrophe Stoffwechselaktivitäten detoxifiziert werden können, wodurch eine Selektion der Pflanze für Methyлотrophe zustande kommen könnte (Jourand *et al.*, 2005;

Kinghorn und Smolenski, 1981; Wink und Mohamed, 2003). Darüber hinaus können epiphytische Methylo trope auf Samen oder Blättern die Samenkeimung und das Pflanzenwachstum durch die Exkretion von Phytohormonen wie Auxin oder Cytokinin beeinflussen und damit weniger stringente Wechselbeziehungen zu Pflanzen eingehen. Im Gegenzug profitieren Methylo trope von den Wechselbeziehungen mit Pflanzen, da die Pflanzen Nährstoffe (z.B. Methanol) bereitstellen (Trotsenko *et al.*, 2001) (1.8.8).

Der Faktor Vegetationstyp integriert jedoch nicht nur die vorherrschenden Pflanzenarten, sondern auch edaphische Faktoren wie z.B. den *in situ* pH-Wert. Dieser Erwartung entsprechend korrelierte der Vegetationstyp signifikant mit dem *in situ* pH-Wert (3.1, Tab. 41). Gleichzeitig ergab die Analyse des MPN-Datensatzes und der Datensätze der Genmarker *mxnA*, *mch* und *fae* eine signifikante Korrelation der methylo trophen Gemeinschaften mit dem *in situ* pH-Wert (3.3.1, 3.3.5, 3.3.7, 3.3.9). Für Methan-oxidierende Methylo trope wurde bereits im Jahr 2003 gezeigt, dass die Gemeinschaftsstruktur vom *in situ* pH-Wert abhängt, denn einige Methanotrophe kommen in neutralen, nicht aber in sauren Böden vor (Knief *et al.*, 2003). Auch für Proben von ehemaligen Mülldeponien wurde mit Hilfe von Genmarkerstudien gezeigt, dass die Gemeinschaft der Methanotrophen vom Boden-pH beeinflusst wird (Chang *et al.*, 2010). Weitere Studien belegen, dass mikrobielle Gemeinschaften in Böden der Exploratorien (Nacke *et al.*, 2011), aber auch in Böden außerhalb der Exploratorien (Frierer und Jackson, 2006; Frierer *et al.*, 2009; Bååth und Anderson, 2003; Sagova-Mareckova *et al.*, 2011), durch den *in situ* pH-Wert beeinflusst werden. Zusammengefasst mit den Ergebnissen dieser Doktorarbeit gibt es damit immer mehr Hinweise darauf, dass der *in situ* pH-Wert ein wichtiger Nischen-definierender Faktor für bakterielle Gemeinschaften in Böden ist.

Der pH-Wert könnte andere, in dieser Doktorarbeit nicht bestimmte Umweltparameter integrieren und so die Gemeinschaft der Methylo trophen indirekt beeinflussen, denn er beeinflusst die Verfügbarkeit von Nährstoffen und Schwermetallen, aber auch die Bodenstruktur (Schinner und Sonnleiter, 1996). Wahrscheinlicher ist jedoch, dass der *in situ* pH-Wert einen direkten Einfluss auf die Gemeinschaft der Methylo trophen hat. pH-Werte, die außerhalb des optimalen Bereiches liegen, können auf Zellebene einen pH-Stress hervorrufen (Frierer und Jackson, 2006) und könnten so eine Selektion von bestimmten methylo trophen Gruppen anhand ihrer physiologischen Eigenschaften bewirken. Die Bestimmung der Zellzahlen in verschiedenen Medien mit Methanol als einziger Kohlenstoffquelle (2.7.3) erlaubt einen Rückschluss auf die Physiologie von Methylo trophen in Böden. Die Kultivierung in Medium mit neutralem pH-Wert lieferte signifikant höhere Zellzahlen als Medium mit saurem pH-Wert (3.3.1, Tab. 44). Wahrscheinlich ist ein Großteil der Methylo trophen im Boden neutrophil. Auch die Tatsache, dass der Großteil der bis heute bekannten methylo trophen Isolate neutrophil ist, deutet darauf hin (Kolb, 2009 a) (1.8.4).

Einige Ergebnisse dieser Doktorarbeit lassen vermuten, dass die Stickstoffverfügbarkeit die methylo trope Mikroorganismen-Gemeinschaft in Böden beeinflussen kann. Die Gemeinschaftsstruktur der Methylo trophen korrelierte im Falle des MPN-Datensatzes, des

*mch*-Datensatzes mit 150 Sequenzen pro Boden und des *fae*-Datensatzes mit der *in situ* Ammonium- oder Nitratkonzentration (3.3.1, Tab. 46, 3.3.7, Tab. 52, 3.3.9, Tab. 54). Eine signifikante Korrelation des Ammonium- oder Nitratgehaltes mit der *mxhF*-Diversität wurde jedoch nicht nachgewiesen (3.3.5, Tab. 49). Ein Effekt der Stickstoffverfügbarkeit auf die methylo tro phe Mikroorganismen-Gemeinschaft wurde daher in dieser Doktorarbeit nicht eindeutig belegt. Die MPN-Analyse ergab, dass die Zugabe von Nitrat zum Medium die Zellzahl der potenziellen Methylo tro phen signifikant erhöhte (3.3.1), was darauf hinweist, dass die meisten Methylo tro phen im Boden nicht in der Lage sind, molekularen Distickstoff zu fixieren. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass die meisten methylo tro phen Arten Nitrat und Ammonium assimilieren (Kolb, 2009 a) (1.8.3). Die Ammonium- und Nitratkonzentration des Bodens sind dynamische Parameter (Farley und Fitter, 1999), während der Vegetationstyp über Jahre hinweg konstant bleibt (Fischer *et al.*, 2010). In dieser Doktorarbeit wurden Daten erhoben, die über das Jahr gemittelt wurden. Eine saisonale Analyse würde möglicherweise einen Einfluss der Stickstoffverfügbarkeit auf die Methylo tro phen im Boden eindeutig belegen. Hinweise auf eine saisonale Dynamik der Methylo tro phen in den Böden der Exploratorien lieferte eine TRFLP-Analyse von *mch* mit Bodenproben, die zu vier verschiedenen Zeitpunkten genommen wurden (Hetz, 2010). Eine derartige saisonale Dynamik wurde des Weiteren für methanotrophe Methylo tro phe in Reisfeldeböden beobachtet (Eller *et al.*, 2005). Die Beobachtung, dass die Gemeinschaft der Methylo tro phen im Boden von der Stickstoffverfügbarkeit beeinflusst werden könnte, stimmt mit Ergebnissen von früheren Studien überein, die zeigten, dass Methanoxida tionsraten vom Ammonium- und Nitratgehalt des Bodens abhängen können (Mancinelli, 1995). Einige Studien zeigten, dass sich das Methanoxida tionspotenzial im Boden durch die Zugabe von Nitrat oder Ammonium erhöhen lässt (z.B. Börjesson und Nohrstedt, 2000; Hilger *et al.*, 2000), während andere Studien Hinweise darauf liefern, dass die Zugabe von anorganischen Stickstoffverbindungen die Methanoxida tion hemmt (Dunfield und Knowles, 1995). Die Assimilation von anorganischem Stickstoff ist energetisch günstiger als die Fixierung von molekularem Distickstoff und kann somit zu einer Stimulation der Methanoxida tion führen (Bodelier und Laanbroek, 2004). Andererseits ist Ammonium ein kompetitiver Inhibitor der Methanmono oxyge nase, was wiederum eine Grund für die hemmende Wirkung von anorganischen Stickstoffverbindungen auf das Methanoxida tionspotenzial sein könnte (Bodelier und Laanbroek, 2004).

Die geographische Lage hat möglicherweise einen Einfluss auf die Diversität der Methylo tro phen im Boden, auch wenn in dieser Doktorarbeit keine Signifikanz nachgewiesen wurde. Die Aufnahmewerte (d.h. die Zusammensetzung der methylo tro phen Gemein schaften) der Grünländer und Wälder eines Exploratoriums waren zueinander oft ähnlicher als zu den Grünländern und Wäldern der anderen Exploratorien (Abb. 20 a, Abb. 22 a, Abb. 26 a). Die Exploratorien unterschieden sich in edaphischen Faktoren wie z.B. dem pH-Wert oder der Nitratkonzentration. Diese Faktoren bestimmten möglicherweise die Methylo tro phen diversität im Boden. Die Gemeinschaft der methylo tro phen *Proteobacteria* in der Phyllosphäre von Blättern, die in den Exploratorien gesammelt wurden, korrelierte ebenfalls mit der geographischen Lage (Wellner *et al.*, 2011). Dabei waren die in dieser



Doktorarbeit bestimmten Zellzahlen ähnlich zu den Zellzahlen von *Methylobacterium* auf *Trifolium repens* Blättern ( $2 \times 10^7$  g<sub>FG</sub><sup>-1</sup>), die in den Exploratorien gesammelt wurden (Wellner *et al.*, 2011). Auf der Oberfläche von Blättern, die im Exploratorium Schorfheide-Chorin gefunden wurden, war die Zellzahl an *Methylobacterium* geringer als auf denen der Exploratorien Hainich und Schwäbische Alb (Wellner *et al.*, 2011). Die Zellzahlen, die in dieser Arbeit für den Boden der Schorfheide-Chorin ermittelt wurden, waren insgesamt ebenfalls niedriger als die Zellzahlen in den Bodenproben der anderen beiden Exploratorien (3.3.1). Es wird angenommen, dass Methylotrrophe von Böden durch die Luft und durch Bodenpartikel auf die Pflanzenoberfläche gelangen können (Romanovskaya *et al.*, 2001). Der Grund für die geringe Zellzahl auf den Blättern von Pflanzen des Exploratoriums Schorfheide-Chorin könnte die geringe Zellzahl von Methylotrophen im Inokulum Boden sein. Dementsprechend wurde gezeigt, dass die Zellzahlen von pathogenen *Salmonella*-Zellen, die auf der Oberfläche von Tomaten detektiert werden können, mit der Zelldichte des Inokulums korrelierten (Iturriaga *et al.*, 2003). Aber nicht nur die Diversität der Methylotrophen in Bodenproben und Blättern der Exploratorien ist abhängig vom Standort, sondern auch die Diversität der *Acidobacteria* kann vom Standort beeinflusst sein (Naether *et al.*, 2012). Ein Einfluss der geographischen Lage auf die Diversität wurde des Weiteren für mikrobielle Gemeinschaften in Böden außerhalb der Exploratorien festgestellt (Frierer und Jackson, 2006). Damit ist die geographische Lage möglicherweise ein Faktor, der Mikroorganismen ganz allgemein beeinflusst.

Die Landnutzungsintensität korrelierte nicht mit dem MPN-Datensatz (3.3.1) oder der Diversität von *mxnA*, *mch* und *fae* (3.3.5, 3.3.7, 3.3.9). Die Hypothese 3 (1.10) wurde damit nicht verifiziert. Dies bedeutet nicht, dass die Landnutzung durch den Menschen die Gemeinschaft der Methylotrophen im Boden nicht beeinflusst. Es ist bekannt, dass der Einsatz von anorganischem Stickstoffdüngern wie Harnstoff die Aktivität von Boden-Methanotrophen erhöht und zu einer Anreicherung von Typ I Methanotrophen führt (Mohanty *et al.*, 2006; Noll *et al.*, 2008). Des Weiteren lieferte eine 16S rRNA-Genanalyse mittels Pyrosequenzierung von gedüngten und ungedüngten Grünländern Hinweise darauf, dass eine geringere Landnutzungsintensität eine höhere bakterielle Diversität zur Folge hat (Will *et al.*, 2010). Ein Effekt der Landnutzungsintensität (z.B. aufgrund von Düngung) auf die Diversität der Methanol-oxidierenden Methylotrophen ist dementsprechend vorstellbar, jedoch möglicherweise durch die Analyse von Bodenproben unterschiedlichen Vegetationstyps schwer nachzuweisen. Die edaphischen Eigenschaften waren innerhalb bestimmter Landnutzungsintensitäten nicht konsistent. Die Landnutzung von Wäldern durch den Menschen hat hinsichtlich der Parameter, die Bodenmikroorganismen beeinflussen, einen anderen Effekt als die Landnutzung von Grünländern. Auch die Geschichte eines Standortes kann dessen edaphische Eigenschaften beeinflussen (Lauber *et al.*, 2008). Informationen über die Landnutzungsintensität alleine können daher nur bedingt Aufschluss über die bakterielle Gemeinschaft im Boden geben.

Eine eindeutige Identifizierung von Taxa, die für Grünländer und Wälder oder für edaphische Faktoren typisch sind, war nicht möglich. So waren z.B. im *mch*-Datensatz *Starkeya*-

verwandte Genotypen sowohl indikativ für Grünländer als auch für Wälder (3.3.7). In dieser Studie wurden die Genotypen lediglich bestimmten Gattungen zugeordnet, da für *mch* und *fae* keine Cut-Off-Werte zur Differenzierung der OTUs auf Speziesebene bestimmt werden konnten (3.3.2). Die Auflösung auf Speziesebene könnte zur Identifizierung von Indikatoren für bestimmte Umweltfaktoren führen.

Es ist wahrscheinlich, dass nicht alle Faktoren identifiziert wurden, die einen Einfluss auf die Gemeinschaft der Methyloprophylen im Boden haben. Die relativen Positionen der Aufnahmen bzw. Plots in den DCA- und CCA-Ordinationsdiagrammen waren oft verschieden (3.3.5, Abb. 20, 3.3.7, Abb. 23). Ein Grund hierfür könnte die limitierte Anzahl der untersuchten Plots sein. Sobald der Plot SEW 9 in die Analysen einbezogen wurde, erhöhte sich auch die Anzahl der Faktoren, die signifikant mit der Genotypendiversität korrelierten. Für den *mch*-Datensatz mit 150 Sequenzen pro Boden wurden so, neben dem Vegetationstyp und dem *in situ* pH-Wert, auch die Nitratkonzentration und der gravimetrische Wassergehalt als wichtige Faktoren identifiziert (3.3.7, Abb. 22). Im *mch*-Datensatz mit 480 Sequenzen pro Boden fehlten die Ergebnisse der Sequenzanalysen von SEW 9. Als wichtige Faktoren wurden in diesem Fall der Vegetationstyp und der *in situ* pH-Wert bestimmt (3.3.7, Abb. 23). Die Sonderrolle von SEW 9 ist durch einen niedrigen *in situ* pH-Wert, aber auch durch eine niedrige Nitrat- und Ammoniumkonzentration begründbar (3.1, Tab. 39). Es ist vorstellbar, dass durch das Einbeziehen von Böden mit *in situ* Parametern, die stark von denen der in dieser Arbeit bestimmten Parameter abweichen, weitere signifikante Parameter identifiziert werden könnten. Des Weiteren ist es möglich, dass Korrelationen der Genotypenzusammensetzung mit Parametern vorliegen, die in dieser Studie nicht gemessen wurden. Weitere wichtige Faktoren könnten z.B. die Bodentemperatur, der Sauerstoffgehalt oder die Methanolkonzentration sein (Kolb, 2009 a) (1.9).

### 4.3 $\alpha$ -Diversität methylotropher Prokaryoten

Insgesamt wurde in dieser Doktorarbeit eine breite Diversität von Methylotrophen in oxischen Böden detektiert (3.3.4, 3.3.6, 3.3.8, 3.3.10). Die Diversität der isolierten Reinkulturen (3.3.10) war teilweise verschieden von der Diversität, die sich aus der Analyse mit molekularen Genmarkern ergab (3.3.4, 3.3.6, 3.3.8). Die Analyse von Genmarkern detektierte *Alpha*-, *Beta*- und *Gammaproteobacteria*. Im Gegensatz zum Isolierungsexperiment wurden keine *Actinobacteria*, *Bacilli*, *Flavobacteriia* oder *Sphingobacteriia* nachgewiesen. Die Gattung *Methylibium* enthält typische Methanoloxidierer der *Betaproteobacteria* (Kolb, 2009 a) und wurde nur durch ihre *mxoF*- und *mch*-Sequenzen (*mxoF*-OTU 19, 24, 25, 26, 27; *mch*-OTU 252) nachgewiesen (3.3.4, 3.3.6). Es wurden jedoch keine *Methylibium*-Reinkulturen isoliert. Ein *mxoF*-OTU (OTU 8) zeigte eine Verwandtschaft zu "*Candidatus Methylobacterium oxyfera*" (Ettwig *et al.*, 2010) (3.3.4). "*Candidatus Methylobacterium oxyfera*" ist ein anaerober Nitrit-reduzierender Organismus, der Sauerstoff als Intermediat bilden und für die Oxidation von Methan nutzen kann (Ettwig *et al.*, 2010). Unter den in dieser Arbeit verwendeten oxischen Isolierungsbedingungen (2.7) war eine Anreicherung dieses Organismus nicht möglich. Um ein vollständiges Bild der Methylotrophen-Diversität zu erhalten, sind folglich sowohl Kultivierung als auch Analysen mit molekularen Genmarkern sinnvoll.

Ein Grund für die detektierte breite taxonomische Vielfalt könnte sein, dass es sich bei der Methylytrophie um einen evolutionär relativ alten Stoffwechselweg handelt (Battistuzzi *et al.*, 2004; Boden *et al.*, 2008; Brocks *et al.*, 2003; Chistoserdova *et al.* 2004). Gene des methylytrophen Stoffwechsels könnten bereits früh in der Evolution vertikal an die evolutionären Nachkommen weitervererbt worden sein. Des Weiteren ist es möglich, dass die Gene für einen methylytrophen Stoffwechsel über lateralen Gentransfer an andere Taxa weitergegeben wurden (Boden *et al.*, 2008). In *Bacillus methanolicus* MGA<sub>3</sub> wurde ein Plasmid nachgewiesen, dass sowohl *mdh* (kodiert für eine NAD(P)-bindende MDH, 1.8.1) als auch Gene des RuMP-Zyklus enthielt und für ein Wachstum von *B. methanolicus* auf Methanol essentiell war (Brautaset *et al.*, 2004). Mittlerweile sind weitere Stämme von *B. methanolicus* bekannt, deren Plasmide und Chromosomen paraloge *mdh*-Genen enthalten. Diese paraloge *mdh*-Gene kodieren für Proteine, die sich in ihrer Affinität für verschiedene Substrate (z.B. Methanol, Ethanol, Propanol) unterscheiden (Krog *et al.*, 2013). Die Übertragung eines solchen Plasmids auf andere grampositive Spezies ist vorstellbar und könnte zu der großen Diversität von Methylytrophen beigetragen haben (Boden *et al.*, 2008). Plasmide von gramnegativen *Bacteria*, die Gene für eine PQQ-MDH enthalten, sind bisher nicht bekannt (Boden *et al.*, 2008; Krog *et al.*, 2013). Das Genom von *Methylobacterium extorquens* AM1 setzt sich zwar aus einem Chromosom (5,51 MBp), einem Megaplasmid (1,26 MBp) und drei Plasmiden (25 kbp, 38 kbp und 44 kbp) zusammen, alle bisher bekannten, in den methylytrophen Stoffwechsel involvierten Gene befinden sich jedoch auf dem Chromosom (Vuilleumier *et al.*, 2009). Auch das Genom von *Methylibium petroleiphilum* PM1 enthält ein Megaplasmid (0,6 MBp), die Gene für die MDH2 sind jedoch chromosomal (4 MBp) (Kane *et al.*, 2007; Chistoserdova *et al.*, 2009). Es gibt damit derzeit keine direkten

Hinweise darauf, dass der laterale Gentransfer für die taxonomische Verbreitung von gramnegativen Methyлотроphen eine wichtige Rolle spielt.

Nicht alle Klassen, die Methanol-oxidierende Arten enthalten, wurden detektiert. *Verrucomicrobiae* wurden weder im Rahmen des Isolierungsexperiments noch durch molekulare Genmarker nachgewiesen. Es handelt sich hierbei um thermoacidophile *Bacteria*, von denen bisher weder *mxoF*-Gene, noch Gene des H<sub>4</sub>MPT-abhängigen Oxidationsweges von Formaldehyd zu Formiat bekannt sind (Chistoserdova *et al.*, 2009, Chistoserdova, 2011; Dunfield *et al.*, 2007; Islam *et al.*, 2008; Pol *et al.*, 2007). Unter den Isolierungsbedingungen und durch die molekularen Genmarker konnte diese Klasse deswegen wahrscheinlich nicht nachgewiesen werden. Alle bisher bekannten methyлотроphen *Verrucomicrobiae* wurden aus geothermalen Standorten isoliert und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass methyлотроphe *Verrucomicrobiae* nur in solchen Habitaten vorkommen (Op den Camp *et al.*, 2009).

In dieser Doktorarbeit erfolgt die Diskussion der Diversität der Reinkulturen basierend auf der taxonomischen Ebene der Gattungen und nicht auf der Ebene der Arten. Eine sichere Zuordnung der Reinkulturen zu bestimmten Arten anhand der Sequenzinformation war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Zur phylogenetischen Unterscheidung der Arten anhand ihrer 16S rRNA Gene wird im Allgemeinen ein Cut-Off-Wert von 97% verwendet (Stackebrandt und Goebel, 1994). Die Artenvielfalt kann generell aber nur dann exakt abgeschätzt werden, wenn 16S rRNA Gene annähernd über ihre gesamte Länge betrachtet werden (Kim *et al.*, 2011). In dieser Arbeit wurden lediglich Teilsequenzen der 16S rRNA Gene der Reinkulturen analysiert (3.3.10, Tab. A im Anhang). Um die Reinkulturen bestimmten Arten zuordnen zu können, müssen auch die physiologischen Eigenschaften der Isolate untersucht werden (Kämpfer und Rosselló-Mora, 2004). Es liegen keine detaillierten Informationen zu den physiologischen Eigenschaften der Reinkulturen vor. Auch die Methanoloxidation der Reinkulturen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen. Die einzigen Kohlenstoff- und Energiequellen im Medium waren Kohlenstoffdioxid, Agar und Methanol (2.7). Unter diesen Kultivierungsbedingungen ist es sehr wahrscheinlich, dass Methyлотроphe angereichert werden (Boden *et al.*, 2008).

#### **4.3.1 *Alphaproteobacteria*, die wichtigste Gruppe der Methyлотроphen in oxischen Böden**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden am häufigsten Mitglieder der *Alphaproteobacteria* als Reinkultur isoliert (3.3.10, Abb. 27) und die Anzahl der *mxoF*-, *mch*- und *fae*-Genotypen dieser Klasse war in allen Böden jeweils am höchsten (3.3.4, 3.3.6, 3.3.8). *Alphaproteobacteria* waren folglich in den methyлотроphen Gemeinschaften der analysierten Böden am häufigsten vertreten. Die Hypothese 2 (1.10) wurde somit verifiziert. Bereits frühere Studien lieferten Hinweise auf eine starke Verbreitung der methyлотроphen *Alphaproteobacteria*. Die meisten bekannten kultivierten methyлотроphen Arten gehören zu

den *Alphaproteobacteria* (Kolb, 2009 a; Tab. 2). Des Weiteren zeigten Studien der *mxoF*-, *mch*- und *fae*-Diversität in marinen und in Süßwassersystemen, dass die Anzahl der Sequenzen, die den *Alphaproteobacteria* zugeordnet wurden, am höchsten war (Kalyuzhnaya *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004). Dies bedeutet auch, dass sich verschiedene Ökosysteme hinsichtlich der Diversität von *mxoF*, *mch* und *fae* auf der Ebene der Klassen nicht stark unterscheiden.

Wahrscheinlich spielen die *Rhizobiales* bei der Methanoloxidation in Böden eine wichtige Rolle. Reinkulturen dieser Ordnung wurden am häufigsten isoliert und gehörten zu 11 verschiedenen Gattungen (*Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Methylobacterium*, *Aminobacter*, *Afipia*, *Hyphomicrobium*, *Mesorhizobium*, *Methylocella*, *Aurantimonas*, *Phyllobacterium*, *Rhodopseudomonas*) (3.3.10, Tab. A im Anhang). Desweiteren war ein Großteil der *mxoF*-OTUs und *mch*-OTUs verwandt zu Genotypen, die zur den *Rhizobiales* gehören (3.3.4, 3.3.6).

Die Ordnung *Rhizobiales* wurde innerhalb der Reinkulturen vor allem durch die Gattungen *Bradyrhizobium* und *Ensifer* repräsentiert, zu denen 20% der Reinkulturen gehörten (Tab. A im Anhang). Im Genom von *Bradyrhizobium japonicum* und *Ensifer meliloti* wurde das Gen *mxoF* nachgewiesen, das große Sequenzhomologie zu *mxoF* aufweist (Kolb, 2009 a) und im Methanolmetabolismus als Gen für eine Methanoldehydrogenase wahrscheinlich eine wichtige Rolle spielt (Fitriyanto *et al.*, 2011). *mxoF* wurde auch im Pyrosequenzierungsdatensatz identifiziert und nimmt im phylogenetischen Mxof-Baum eine Sonderstellung ein (Abb. 18). Diese Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass *Bradyrhizobium* und *Ensifer* wahrscheinlich Methanol-oxidierende Arten enthalten, die im Boden eine entscheidende Rolle spielen, auch wenn die Fähigkeit zur Methanoloxidation innerhalb dieser beiden Gattungen bisher nicht direkt an Isolat nachgewiesen wurde (Kolb, 2009 a).

Neben *Bradyrhizobium* und *Ensifer* sind wahrscheinlich *Methylobacterium*-Arten wichtige Methylophile im Boden. Der Großteil der *mxoF*-Sequenzen (78%, OTU 2) wurde dieser Gattung zugeordnet (3.3.4). Des Weiteren wurde die Gattung *Methylobacterium* durch die Isolierung von Reinkulturen (5 Stämme) in den Böden der Exploratorien nachgewiesen (Tab. A im Anhang). Die Tatsache, dass diese klassischen Methylophilen isoliert wurden zeigt, dass die hier verwendeten Medien zur Anreicherung von methylophilen *Bacteria* geeignet sind. Typische Methanol-oxidierende *Methylobacterium*-Arten sind z.B. *M. persinicum*, *M. komagatae* oder *M. brachiatum* (Kato *et al.*, 2008; Kolb, 2009 a). Die Gattung *Methylobacterium* ist nicht nur im Boden häufig, sondern ist auch in der Phyllosphäre dominant (Delmotte *et al.*, 2009; Holland *et al.*, 2002; Mizuno *et al.*, 2012; Wellner *et al.*, 2011). Die Phyllosphäre wird möglicherweise während der Pflanzenwachstums mit methylophilen *Bacteria* inokuliert (Romanovskaya *et al.*, 2001). Es ist daher gut erklärbar, dass auf unter- wie oberirdischen Teilen von Pflanzen *Methylobacterium*-Spezies häufig vertreten sind.

Die Bedeutsamkeit einiger Gattungen innerhalb der *Rhizobiales* wurde durch Genmarker-basierte Studien aufgedeckt, jedoch nicht durch die Isolierung von Reinkulturen. Das häufigste *mch*-OTU, OTU 178 (Abb. 21), war nicht nur nah verwandt zu *mch* von *Starkeya novella*, sondern auch zu GSC 1, einer Sequenz, die in Bakterien vorkommt, die durch *in situ* relevante Methanolkonzentrationen angeregt wurden (3.2.3). Die Gattung *Starkeya* spielt daher möglicherweise bei der Oxidation von Methanol im Boden eine entscheidende Rolle. *Starkeya novella* ist fakultativ methylotroph und kann auf Methanol wachsen (Im *et al.*, 2006) (Tab. 2). Die Anreicherung auf Medium mit Methanol gelingt insbesondere dann, wenn dem Medium Pantothersäure oder Hefeextrakt zugesetzt wird (Kelly *et al.*, 2000). Das Medium M1 enthielt Pantothersäure und ist daher zur Anreicherung von *Starkeya*-Reinkulturen geeignet. Dennoch wurde diese Gattung im Isolierungsexperiment nicht nachgewiesen (Tab. A im Anhang).

Ein häufiges *mxoF*-OTU (OTU 6) war verwandt zu Sequenzen von *Methyloferula stellata* (Abb. 18). Auch in diesem Fall wurden keine Reinkulturen erhalten, die zu dieser Gattung gehörten. Möglicherweise war der pH-Wert der Medien (3,1 und 6,8) grenzwertig für eine Anreicherung, denn *Methyloferula stellata* wurde erstmals aus saurem Moorboden isoliert und wächst bei pH-Werten zwischen 3,5 und 7,2 (Vorobev *et al.*, 2011).

Die Bedeutsamkeit der Gattung *Methylocella* wurde vor allem durch die relative Häufigkeit des *mch*-OTUs 201 deutlich. Die Gattung *Methylocella* enthält Methanol-oxidierende neutrophile mesophile Arten, die aus Böden isoliert wurden (Kolb, 2009 a). Im Gegensatz zu *Starkeya* und *Methyloferula* wurde diese Gattung auch durch die Isolierung von Reinkulturen nachgewiesen (ein Stamm, Tab. A im Anhang).

#### 4.3.2 Wenig abundante Methylotrophe in oxischen Böden

Einige Methylotrophe wurden lediglich anhand von wenigen Genmarkersequenzen identifiziert und spielen daher bei der Oxidation von Methanol in oxischen Böden wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle. Die Anzahl der Reinkulturen war im Vergleich zu der Anzahl der analysierten Genmarkersequenzen gering. Der Datensatz der Reinkulturen war nicht repräsentativ und liefert daher lediglich Hinweise auf wenig abundante Methylotrophe.

Zwar waren *Alphaproteobacteria* innerhalb der methylotrophen Gemeinschaften in oxischen Böden insgesamt dominant (4.3.1), einige Gattungen wurden jedoch lediglich anhand von wenigen Reinkulturen nachgewiesen. Dazu gehörten *Aminobacter* (fünf Stämme), *Afipia* (drei Stämme), *Hyphomicrobium* (drei Stämme) und *Mesorhizobium* (ein Stamm) (Tab. A im Anhang). Die Gattung *Hyphomicrobium* wurden gleichzeitig mittels Genmarker-basierter Studien nachgewiesen, die entsprechenden OTUs (*mxoF*-OTUs 13, 14, 33, Abb. 18; *mch*-OTUs 258, 259, 261, 262, 266, 267, Abb. 12) enthielten jedoch nur einen geringen Anteil der Sequenzen. Innerhalb dieser vier Gattungen sind Methanol-oxidierende Arten bekannt. Dies

ist ein guter Hinweis darauf, dass es sich bei den entsprechenden Reinkulturen um Methyilotrophe handelte, die das Methanol im Medium nutzten. Bekannte Methanol-oxidierende Arten sind z.B. *Aminobacter ciceronei*, *Hyphomicrobium denitrificans*, *Afipia felis* und *Mesorhizobium loti* (Kolb, 2009 a).

Die Sequenzen von Genmarkern, die den *Betaproteobacteria* zugeordnet wurden (3.3.4, 3.3.6), waren wenig abundant und lediglich ein geringer Anteil der Reinkulturen gehörte zu dieser Klasse (Abb. 27). Unter den insgesamt 15 isolierten Stämmen der Klasse *Betaproteobacteria* war auch eine Reinkultur, die auf Medium mit saurem pH-Wert isoliert wurde. Sie zeigte eine nahe Verwandtschaft (98% Sequenzidentität der 16S rRNA Gene, Tab. A im Anhang) zu *Burkholderia phenazinium* (ehemals *Pseudomonas phenazinium*; Viallard *et al.*, 1998). *B. phenazinium* ist acidotolerant und hat ein pH-Optimum bei pH-Wert 5 (Bell und Turner, 1973). 97% der Reinkulturen wurden auf neutralem Medium angereichert. Es ist bekannt, dass die meisten Methyilotrophen neutrophil sind (Kolb, 2009 a; Tab. 2). Es ist daher nicht verwunderlich, dass insgesamt mehr Reinkulturen auf neutralem als auf saurem Medium angereichert wurden. *Burkholderia* (neun Stämme) war nach *Bradyrhizobium* und *Flavobacteria* die dritthäufigste Gattung, die im Rahmen des Isolierungsexperiments detektiert wurde. Einige Arten innerhalb dieser Gattung wie z.B. *B. graminis* oder *B. xenovorans* besitzen *xoxF* (Chain *et al.*, 2006; Kolb, 2009 a). *xoxF* spielt möglicherweise eine Rolle bei der Regulation der PQQ-abhängigen Methanoldehydrogenase (Skovran *et al.*, 2011). Im Genom von *B. xenovorans* wurden die Gene für drei Formaldehydoxidationswege nachgewiesen. Die Oxidation von C1-Verbindungen durch *B. xenovorans* ist wahrscheinlich möglich (Kolb, 2009 a), konnte aber bisher nicht nachgewiesen werden (Chain *et al.*, 2006). Viele weitere *Burkholderia*-Arten wie z.B. *B. fungorum*, *B. graminis* und *B. phytofirmans* wurden hinsichtlich einer methyilotrophen Lebensweise nicht untersucht (Coenye *et al.*, 2001; Sessitsch *et al.*, 2005; Viallard *et al.*, 1998). Die Tatsache, dass *Burkholderia*-Reinkulturen in dieser Arbeit auf Medium mit Methanol isoliert wurden ist ein guter Hinweis darauf, dass zumindest einige *Burkholderia*-Arten tatsächlich Methanol oxidieren können.

In dieser Doktorarbeit wurden *Variovorax*-Reinkulturen auf Medium mit Methanol isoliert (4 Stämme), die wahrscheinlich methyilotroph sind. Erst im Jahr 2005 wurde entdeckt, dass *Variovorax paradoxus* methyilotroph auf Medium mit Methanol wachsen kann (Anesti *et al.*, 2005). Bis dahin war man der Meinung, dass ein methyilotrophes Wachstum von *Variovorax* nicht möglich ist (Willems *et al.*, 1991).

*Gammaproteobacteria* wurden durch die Isolierung von Reinkulturen der Gattungen *Pseudomonas* und *Luteibacter* (Tab. A im Anhang) und durch die Analyse des Genmarkers *mxoF* in Form von wenigen Sequenzen in OTU 4 (Abb. 18, Abb. 19) detektiert. Möglicherweise spielt diese Klasse, gleich den *Betaproteobacteria*, bei der Methanoloxidation im Boden eine eher untergeordnete Rolle. Insgesamt wurden sieben *Pseudomonas*-Reinkulturen isoliert (Tab. A im Anhang). *Pseudomonas*-Arten sind typischerweise heterotroph. Ein Wachstum auf C1-Verbindungen wurde in der Regel nicht

untersucht (z.B. Achouak *et al.*, 2000; Baïda *et al.*, 2001; Verhille *et al.*, 1999). Hinweise darauf, dass es in Flüssen fakultative Methyilotrophe innerhalb der Gattung *Pseudomonas* geben könnte, lieferte ein Isolierungsexperiment mit C1-haltigem Medium (Boden *et al.*, 2008). *Pseudomonas mendocina* kann C1-Verbindungen nutzen, wächst jedoch nicht auf Methanol (Boden *et al.*, 2008; Kolb, 2009 a) (Tab. 1).

16 Reinkulturen wurden der Gattung *Flavobacterium* zugeordnet (Tab. A im Anhang). *Flavobacteriia* galten lange als nicht methyilotroph (Kolb, 2009 a; Tab. 2). Das Wachstum von *Flavobacterium aquidurens* und *Flavobacterium hercynium* auf C1-Verbindungen wurde nicht untersucht (Cousin *et al.*, 2007). Es ist möglich, dass die Fähigkeit dieser beiden Arten zur methyilotrophen Lebensweise vorhanden ist, bisher aber nicht entdeckt wurde. Erste Hinweise auf methyilotrophe *Flavobacterium*-Stämme wurden erst im Jahr 2008 erhalten (Boden *et al.*, 2008). Zwei *Flavobacterium*-Stämme (MMA/2 und MSA/1) wurden in Medium mit Methanol als einziger Kohlenstoffquelle aus einem Fluss isoliert (Boden *et al.*, 2008). Im Jahr 2010 wurde eine fakultativ methyilotrophe *Flavobacterium*-Art beschrieben (Madhaiyan *et al.*, 2010). *Flavobacterium glycines* Gm-149 wurde aus der Rhizosphäre von Sojabohnen isoliert und nutzt neben Succinat auch Methanol (Madhaiyan *et al.*, 2010) (Tab. 2).

Insgesamt sind mehr gramnegative als grampositive methyilotrophe Arten bekannt (Anthony, 1982; Kolb, 2009 a). Dementsprechend gehörte ein geringer Anteil der Reinkulturen (22%) zu den grampositiven Klassen *Actinobacteria* und *Bacilli* (3.3.10, Abb. 27). Die Genmarker-basierten Studien lieferten keine Informationen über grampositive Methyilotrophe, da die in dieser Doktorarbeit eingesetzten Primer nicht zum Nachweis von grampositiven Organismen geeignet waren (Chistoserdova *et al.*, 2009) (1.9). Ein Teil der Reinkulturen gehörte zu Gattungen, von denen methyilotrophe grampositive Arten bekannt sind. Dazu gehören die Reinkulturen, die nah verwandt waren zu Arten von *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter* und *Rhodococcus*. Methanol-oxidierende Arten sind z.B. *Bacillus methanolicus*, *Mycobacterium vaccae*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium smegmatis* und *Arthrobacter methyilotrophicus* (Kolb, 2009 a). *Rhodococcus*-Arten sind im Allgemeinen heterotroph und kommen in Böden vor, wo sie eine große Bandbreite an organischen Verbindungen abbauen (McLeod *et al.*, 2006). Oftmals wurde bei der Charakterisierung von *Rhodococcus*-Arten wie z.B. *Rhodococcus globerulus* (Táncsics *et al.*, 2008) nicht getestet ob die Fähigkeit zur Methyilotrophie vorhanden ist. Inzwischen wurden jedoch ein *Rhodococcus erythropolis* Stamm in Medium mit Methanol als einziger Kohlenstoffquelle aus einem Fluss (Boden *et al.*, 2008) und der fakultativ methyilotrophe Stamm *Rhodococcus* sp. EH831 aus Petroleum kontaminiertem Boden isoliert, die auf Methanol wachsen können (Lee *et al.*, 2010 b).

#### 4.3.3 Hinweise auf neue Methyilotrophe

Einige Reinkulturen wurden Gattungen zugeordnet, von denen bisher keine methyilotrophen Arten bekannt sind. Darunter waren Reinkulturen der Gattungen *Aurantimonas* (vier



Stämme), *Caulobacter* (zwei Stämme), *Inquilinus* (ein Stamm), *Phyllobacterium* (vier Stämme) und *Rhodopseudomonas* (2 Stämme) (Tab. A im Anhang), die zu den *Alphaproteobacteria* gehörten. Ob ein Wachstum der Arten dieser Gattungen auf C1-Verbindungen möglich ist, wurde in früheren Studien nicht getestet (z.B. Abraham *et al.*, 1999; Coenye *et al.*, 2002; Denner *et al.*, 2003; Janssen und Harfoot, 1991; Jurado *et al.*, 2006; Mantelin *et al.*, 2006; Mergaert *et al.*, 2002; Ramana *et al.*, 2012; Valverde *et al.*, 2005). Darüber hinaus wurden Reinkulturen isoliert, die zu den *Betaproteobacteria* gehörten und keine Verwandtschaft zu bekannten Methyлотrophen zeigten (zwei Stämme). Diese Reinkulturen gehörten zu den Gattungen *Herbaspirillum* und *Collimonas*. In früheren Studien wurde nicht untersucht, ob Arten dieser beiden Gattungen C1-Verbindungen nutzen können (Baldani *et al.*, 1986; de Boer *et al.*, 2004). Für *Collimonas fungivorans* ist bekannt, dass das Wachstum dieser Art durch das Vorhandensein von lebenden Hyphen gefördert wird (de Boer *et al.*, 2004). Es besteht daher die Möglichkeit, dass die *Collimonas*-Reinkultur symbiotisch mit kontaminierenden Pilzen interagierte und so ein Wachstum erst möglich wurde. Es wurde eine *Luteibacter*-Reinkultur (*Gammaproteobacteria*) isoliert. Bisher wurde jedoch von keiner methyлотrophen *Luteibacter*-Art berichtet (z.B. Johansen *et al.*, 2005; Kämpfer *et al.*, 2009). Möglicherweise ist die Methyлотrophie daher innerhalb der *Alpha*-, *Beta*- und *Gammaproteobacteria* weiter verbreitet als bisher angenommen.

Es wurden aber auch grampositive Reinkulturen isoliert, die zu Gattungen gehörten, von denen bisher keine Methanol-oxidierenden Arten bekannt sind. Ein Teil der Reinkulturen gehörte zu den Gattungen *Paenibacillus*, *Microbacterium*, *Streptomyces*, *Lapillicoccus* und *Williamsia* (Tab. A im Anhang). Ob ein Wachstum der Arten dieser Gattungen auf C1-Verbindungen möglich ist, wurde bisher nicht getestet (z.B. Bae *et al.*, 2010; Kageyama *et al.*, 2006; Kämpfer *et al.*, 1999; Uetanabaro *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2010). Darüber hinaus wurde eine Reinkultur isoliert, die der Gattung *Nocardioides* zugeordnet wurde. Der *Nocardioides*-Stamm SAC-4 ist fakulativ methyлотroph, kann aber kein Methanol nutzen, sondern wächst auf Methylchlorid (McAnulla *et al.*, 2001; Kolb, 2009 a). Die Anreicherung von Reinkulturen dieser Gattung auf Medium mit Methanol ist ein guter Hinweis darauf, dass es auch Methanol-oxidierende *Nocardioides*-Arten gibt.

Die Literatur liefert keine Hinweise darauf, dass innerhalb der Klasse *Sphingobacteriia* methyлотrophe Arten vorkommen. Dennoch wurden in dieser Arbeit Reinkulturen isoliert, die zu dieser Klasse gehörten (3.3.10). Darunter waren Reinkulturen, die den Gattungen *Pedobacter*, *Mucilaginibacter* und *Chitinophaga* zugeordnet wurden. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass auch innerhalb der Klasse *Sphingobacteriia* Methanol-oxidierende Arten vorkommen.

In dieser Doktorarbeit wurden zwei neue, bisher nicht beschriebene Arten (Reinkulturen 48 und 63, Tab. A im Anhang) in Medium mit Methanol isoliert. Die analysierten 16S rRNA Gensequenzen waren länger als 1000 Bp und die Sequenzidentitäten zum nächstverwandten, kultivierten Organismus lagen bei 93% und 91%. Durch die Analyse der Genmarker wurden neue Genotypen wie z.B. die *mxoF*-OTUs 17 und 22 (3.3.4) detektiert.

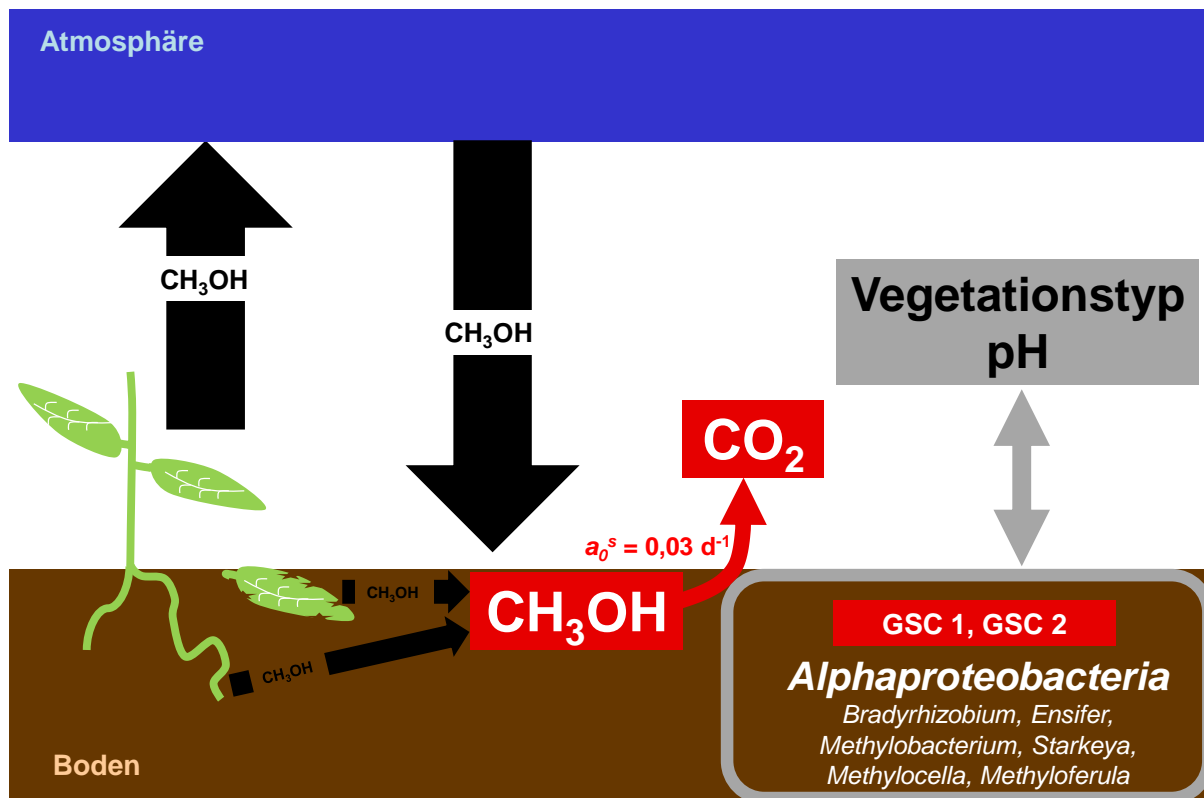
Insgesamt wurden in dieser Doktorarbeit damit viele Hinweise darauf gefunden, dass die Diversität der Methyloprophen größer ist als bisher angenommen wurde.

#### 4.3.4 Nicht-methyloprope Taxa

*Planctomyceae* wurden nur durch die Analyse von *fae* detektiert und sind nicht methyloproph. *Planctomyceae* nutzen *Fae* wahrscheinlich zur Detoxifikation von Formaldehyd (Chistoserdova *et al.*, 2004). Bei den *Planctomyceae* handelt es sich um eine evolutionär relativ alte Gruppe. Gene des reduktiven C1-Stoffwechsels könnten in den *Planctomyceae* entstanden und früh in der Erdgeschichte zu den *Archaea* und den *Bacteria* durch lateralen Gentransfer übertragen worden sein. Gene des C1-Stoffwechsels kommen auch in methanogenen *Euryarchaeota* vor. Die Evolution von *fae* ist komplex, da es im Laufe der Geschichte immer wieder zu Duplikationen dieses Gens gekommen ist (Chistoserdova *et al.*, 2004). In dieser Doktorarbeit wurden folglich durch die Analyse des Genmarkers *fae* auch Organsimen detektiert, die nicht methyloproph sind, was die Aussagekraft der statistischen Ergebnisse vermindert. Hier wird ein Nachteil von Genmarker-basierten Analysen gegenüber der Isolierung von Reinkulturen deutlich, denn physiologische Eigenschaften können durch die Amplikon-Pyrosequenzierung nicht direkt bestimmt werden.

#### 4.4 Modell: Atmosphärische Methanoloxidation in oxischen Böden und Nischen-definierende Faktoren methylopropher Gemeinschaften

Pflanzen sind die wichtigsten Methanolquellen in terrestrischen Ökosystemen. Es ist bekannt, dass einige epiphytische Methyloprope von Pflanzen emittiertes Methanol nutzen und so eine wichtige Senke im globalen Methanolkreislauf sind (Vorholt, 2012). Methanol, das von lebenden und toten Pflanzen emittiert wird, gelangt unter anderem über atmosphärische Deposition in den Boden (Abb. 28). Die metabolische Aktivität von Methyloprophen in Böden könnte daher ebenfalls die atmosphärische Methanolkonzentration beeinflussen. *In situ* relevante Methanolkonzentrationen von 0,05  $\mu\text{M}$  (entspricht 0,002  $\mu\text{mol}$  Methanol pro Gramm Trockengewicht des Bodens) wurden in Bodenaufschlämmungen zu  $\text{CO}_2$  dissimiliert (Abb. 28). Die spezifische Affinität  $a_s^0$  von Grünlandböden lag bei 0,03  $\text{d}^{-1}$  (Abb. 28). Zwei *mch*-Genotypen (GSC 1 und GSC 2) wurden durch die Supplementation der Bodenaufschlämmungen von HEG 6 mit Methanol angeregt. Methyloprope in Böden können folglich *in situ* relevante Methanolkonzentrationen oxidieren, was bedeutet, dass die Hypothese 1 verifiziert wurde und die Ziele 1 und 2 dieser Doktorarbeit erreicht wurden (1.10).



**Abb. 28:** Atmosphärische Methanoloxidation in oxischen Böden und Nischen-definierende Faktoren methyloproteobakterieller Gemeinschaften. Schwarze Pfeile, Methanolemission durch Pflanzenteile und Methanoldeposition; Roter Pfeil, Methanoloxidation von *in situ* relevanten Methanolkonzentrationen;  $a_0^s$ , spezifische Affinität der Grünlandböden FG und HEG 6 für Methanol; Grauer Rahmen, Gemeinschaft der Methyloproteobakterien in oxischen Böden; GSC 1 und GSC 2, *mch*-OTUs, die in Aufschlammungen von HEG 6 durch *in situ* relevante Methanolkonzentrationen angeregt wurden und verwandt waren zu *Alphaproteobacteria*; Graues Rechteck enthält Parameter, die mit der Gemeinschaft der Methyloproteobakterien in Böden korrelierten.

GSC 1 und GSC 2 wurden den *Alphaproteobacteria* zugeordnet, die in den hier analysierten Böden die häufigsten Methyloproteobakterien waren (Hypothese 2, 1.10). Das zweite Ziel dieser Doktorarbeit, die Analyse der Gemeinschaft der Methyloproteobakterien in oxischen Böden, wurde erreicht (1.10). Insbesondere *Rhizobiales* war die dominierende Ordnung innerhalb der Methyloproteobakteriengemeinschaften in Böden. Diese Ordnung wurde vor allem durch die Gattungen *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Methylobacterium*, *Starkeya*, *Methylocella* und *Methyloferula* repräsentiert (Abb. 28). Die Klassen *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Flavobacteriia*, *Actinobacteria* und *Bacilli* waren weniger häufig vertreten und spielten wahrscheinlich bei der Oxidation von Methanol in oxischen Böden eine untergeordnete Rolle. Die Gemeinschaft der Methyloproteobakterien wurde dabei durch den Vegetationstyp (Abb. 28), nicht aber durch die Landnutzungsintensität beeinflusst. Die Hypothese 3 (1.10) ist damit nur teilweise gültig. Der *in situ* pH-Wert war ein Parameter, der

mit dem Vegetationstyp und der Diversität der Methyloprophen signifikant korrelierte. Darüber hinaus deuten einige Ergebnisse dieser Doktorarbeit auf einen Einfluss der Stickstoffverfügbarkeit auf die methyloprophen Mikroorganismen-Gemeinschaft hin, was jedoch nicht eindeutig belegt werden konnte. Andere edaphische Parameter wie der gravimetrische Wassergehalt, der Gesamtkohlenstoffgehalt und der Gesamtstickstoffgehalt der Böden korrelierten insgesamt nicht signifikant mit der methyloprophen Mikroorganismen-Gemeinschaft.

## 4.5 Diversitätsanalyse durch Amplikon-Pyrosequenzierung

Insgesamt wurden in dieser Arbeit mehr als 200.000 *mxnF*-, *mch*- und *fae*-Sequenzen ausgewertet (3.3.3, Tab. 47). Die Anzahl der Sequenzen der Datensätze wurde durch die Anwendung von AmpliconNoise und der damit verbundenen Entfernung von potenziellen Fehlsequenzen um etwa die Hälfte reduziert (3.3.3, Tab. 47). Eine Reduktion des Datensatzes um 50% durch die Anwendung von AmpliconNoise ist nicht ungewöhnlich (Quince *et al.*, 2011). Die Fehlerrate der Pyrosequenzierung liegt bei 1,07% (Gilles *et al.*, 2011) und ist vergleichbar mit der Fehlerrate der Sangersequenzierung (0,001 bis mehr als 1%; Ewing *et al.*, 1998; Hoff, 2009; Keith *et al.*, 1993; Noguchi *et al.*, 2006; Richter *et al.*, 2008). Bei der Pyrosequenzierung ist jedoch im Gegensatz zur Sangersequenzierung eine wiederholte Sequenzierung von einzelnen Genotypen nicht möglich, da die Pyrosequenzierung keinen Klonierungsschritt beinhaltet, sondern einzelne DNA-Moleküle über eine Emulsions-PCR amplifiziert werden (2.8.9). Frühere Studien der Diversität von 16S rRNA Genotypen mit Hilfe der Pyrosequenzierungstechnologie lieferten hohe OTU-Zahlen und führten zu der Schlussfolgerung, dass Taxa mit einem geringen Anteil an der gesamten Anzahl der analysierten Sequenzen in der Umwelt weit verbreitet sind (Huber *et al.*, 2007; Quince *et al.*, 2011; Sogin *et al.*, 2006). Erst später wurde zunehmend klar, dass die hohe Anzahl an OTUs wahrscheinlich zumindest teilweise durch Fehlsequenzierungen zustande kam (Kunin *et al.*, 2010; Quince *et al.*, 2009; Quince *et al.*, 2011). Diversitätsanalysen mit Hilfe der Pyrosequenzierungstechnologie galten bis zur Entwicklung von Softwaretools zur Bereinigung von Sequenzierungsfehlern als nicht reproduzierbar (Zhou *et al.*, 2011). Insbesondere der Einsatz von Primern mit Kennsequenzen (Barcodes), die eine Zuordnung der Sequenzen zu verschiedenen Proben möglich machen (2.8.4, 2.8.9), reduziert die Reproduzierbarkeit im Vergleich zu einer nachträglichen Ligation der amplifizierten Sequenzen mit der Kennsequenz (Berry *et al.*, 2011).

In dieser Arbeit wurde für die erste Amplikon-Pyrosequenzierung eine Mischprobe mit Amplifikaten von *mxnF*, *mch* und *fae* hergestellt (2.8.9.1). Die Sequenzausbeute von *mxnF* war in dieser ersten Sequenzierung gering. Die Probe für die zweite Sequenzierung bestand lediglich aus *mxnF*-Amplifikaten und ergab dementsprechend eine hohe Anzahl auswertbarer Sequenzen. Der Grund für die geringe Sequenzausbeute der ersten Sequenzierung ist möglicherweise, dass die *mxnF*-Amplifikate länger waren als die *mch*- und *fae*-Amplifikate. Im Laufe dieser Doktorarbeit wurde dann auch nachgewiesen, dass die

Effektivität der Emulsions-PCR von der Länge eines PCR-Produktes abhängen kann (Iwai *et al.*, 2010). Es ist vorstellbar, dass in der Emulsions-PCR der ersten Sequenzierung vorwiegend die kürzeren Amplikons der Genmarker *mch* und *fae* amplifiziert wurden.

Insgesamt wurden weniger *mxoF*-OTUs als *mch*- oder *fae*-OTUs detektiert, obwohl die Gesamtzahl der gefilterten *mxoF*-Sequenzen höher war als die der *mch*- und *fae*-Sequenzen. Der Shannon-Index der *mxoF*-Diversität war dementsprechend kleiner als die Shannon-Indizes für *mch*- und *fae*-Datensätze (3.3.3, Tab. 47). Ein Grund für die hohe *mch*- und *fae*-Diversität im Vergleich zu der von *mxoF* könnte die weite Verbreitung des H<sub>4</sub>MPT-abhängigen Weges (1.7.2) innerhalb der Methyloprophen sein (1.9) (Chistoserdova, 2011). Wahrscheinlich kann durch die Analyse der Genmarker *mch* und *fae* eine breitere Diversität von Methyloprophen detektiert werden als durch die Analyse von *mxoF*. Ein weiterer Grund für die hohen Shannon-Indizes von *mch* und *fae* könnte das hohe evolutionäre Alter des H<sub>4</sub>MPT-abhängigen Weges sein. In den Schlüsselgenen dieses Stoffwechselweges konnten sich im Laufe der Evolution möglicherweise viele Mutationen anhäufen, was in einer hohen Divergenz der Sequenzen von verschiedenen Taxa resultieren würde (Chistoserdova, 2011). Ein Cut-Off-Wert zur Unterscheidung der *mch*- und *fae*-Sequenzen auf Spezies-Ebene konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt werden, da nur von wenigen Stämmen sowohl *mch*- bzw. *fae*-Sequenzen als auch Sequenzen der 16S rRNA Gene in internationalen Nukleotidsequenzdatenbanken vorhanden waren (3.3.2). Eine Überschätzung der *mch*- und *fae*-OTUs ist jedoch unwahrscheinlich, da der gewählte Cut-Off-Wert für die *mch*- und *fae*-Analyse auf dem Datensatz selbst basierte und höher war als der Cut-Off-Wert für die *mxoF*-Analyse (3.3.2).

## 4.6 Offene Fragen

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass methyloprope Mikroorganismen-Gemeinschaften in oxischen Böden das Potenzial haben *in situ* relevante Methanolkonzentrationen zu oxidieren. Mit diesem Ergebnis wurde eine grundlegende Annahme von Modellstudien des globalen Methanolkreislaufes (Galbally und Kristine, 2002; Jacob *et al.*, 2005) untermauert. Ein wichtiger Schritt in diesem Zusammenhang wäre es, die tatsächliche Methanolkonzentration in verschiedenen Böden und Pflanzenteilen zu bestimmen. Vergleiche von apparenten kinetischen Parametern der Methanoloxidation in verschiedenen terrestrischen Ökosystemen konnten nur bedingt gemacht werden, da weiterführende Studien hierzu fehlen. Des Weiteren konnte nicht abschließend geklärt werden, ob die Methanoloxidation in oxischen Böden einer biphasischen Kinetik folgt. Weitere Untersuchungen der Kinetik der Methanoloxidation in terrestrischen Ökosystemen und die Identifizierung von Methyloprophen, die hinsichtlich der Methanoloxidation unter *in situ* Bedingungen eine Schlüsselfunktion haben, sind nötig. Eine mögliche Methode *in situ* relevante, nicht-kultivierte Methyloprope zu erfassen, ist die stabile Isotopenbeprobung („Stable Isotope Probing“, SIP) (Radajewski *et al.*, 2000), bei der man <sup>13</sup>C-

Methanolkonzentrationen im mikromolaren Bereich supplementieren müsste. Derart geringe Substratkonzentrationen haben geringe Mengen an markierten Nukleinsäuren zur Folge. Die Kombination dieser Technologie mit der „Multiple Displacement Amplification“ zur Vermehrung von geringen DNA Mengen hat sich als gute Strategie herausgestellt, um unter *in situ* Bedingungen aktive Methylophorie im Meerwasser nachzuweisen (Neufeld *et al.*, 2008) und wäre auch für terrestrische Ökosysteme anwendbar.

Wichtige Umweltparameter, die die Gemeinschaft der Methylophoren in oxischen Böden beeinflussen, wurden in dieser Arbeit identifiziert. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass weitere, hier nicht untersuchte Faktoren existieren, die mit der Gemeinschaftsstruktur der Methylophoren korrelieren (4.2). Solche Faktoren könnten z.B. die Bodentemperatur oder die Salzkonzentration (1.8) sein. In zukünftigen Studien wäre es daher sinnvoll, weitere Umweltparameter in die statistischen Analysen mit einzubeziehen. Desweiteren sollten mehr Plots untersucht werden, um die Repräsentativität der Studie zu steigern.

Die Diversität von Methylophoren im Boden wurde in dieser Arbeit mit kultivierungsabhängigen als auch Genmarker-basierten Techniken analysiert. Beide Techniken waren zur Diversitätsanalyse von Methylophoren geeignet, hatten aber auch bestimmte Schwächen (1.9). Durch die Isolierung von Reinkulturen wurden zahlreiche Gattungen identifiziert, von denen bisher keine methylophoren Arten bekannt sind. Im weiteren Verlauf dieser Studie wäre es sinnvoll herauszufinden, ob die isolierten Stämme zur Oxidation von Methanol fähig sind. Dazu wären radiochemische Methoden basierend auf der Zugabe von  $^{14}\text{C}$ -Methanol denkbar, aber auch weniger aufwendige Kultivierungsversuche in flüssigem Medium mit und ohne Methanol.

Die Genmarker-basierten Untersuchungen lieferten keine Informationen über die Diversität von grampositiven Methylophoren. Die Entwicklung von Primersystemen zur Amplifikation von Methanoldehydrogenasen von grampositiven Mikroorganismen wäre ein wichtiger Schritt, um umfassendere Informationen über methylophore Mikroorganismen-Gemeinschaften zu erhalten. Ein anderer, relativ neuer Ansatz, methylophore Gemeinschaften molekularbiologisch zu analysieren ist der Einsatz von Primersystemen zur Amplifikation von Genen des Serinzyklus oder des RuMP-Zyklus (Hung *et al.*, 2012). Insgesamt gilt, dass der Einsatz von möglichst vielen Primersystemen die Wahrscheinlichkeit einer umfassenden Analyse der Diversität der Methylophoren erhöht. Eine weitere Möglichkeit methylophore Mikroorganismen-Gemeinschaften in Böden umfassend zu analysieren, wäre die funktionelle Metagenomanalyse. Bei dieser Methode wird nach einer SIP-Analyse eine "Whole Genome Shotgun"-Sequenzierung der markierten DNA durchgeführt und die Sequenzen anschließend ausgewertet (Kalyuzhnaya *et al.*, 2011). Durch die funktionelle Metagenomanalyse können daher auch Methylophorie nachgewiesen werden, die nicht durch bekannte funktionelle Primersysteme erfasst werden.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Methanol ist ein klimarelevantes Spurengas und verstärkt die Bildung von troposphärischem Ozon. Pflanzen sind die wichtigsten Quellen von Methanol in terrestrischen Ökosystemen. Die jährliche Emissionsrate von Methanol ist vergleichbar mit der von Methan. Methylo tro phe *Bacteria* können Verbindungen ohne Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung wie Methanol oder Methan als Substrat nutzen und sind damit potenzielle biologische Senken von klimarelevanten Verbindungen. Es bekannt, dass einige Methylo tro phe in der Phyllosphäre Methanol, das von oberirdischen Pflanzenteilen emittiert wird, als Substrat nutzen und gleichzeitig das Pflanzenwachstum z.B. durch die Bildung von Wachstumshormonen fördern können. Durch die metabolische Aktivität von Methylo tro phen in der Phyllosphäre kann daher die Methanolkonzentration in der Atmosphäre verringert werden. Pflanzen werden möglicherweise durch methylo tro phe Bakterien in umgebendem Boden inokuliert, die ebenso einen Einfluss auf den globalen Methanolhaushalt haben können. Unterirdische Pflanzenteile und die atmosphärische Deposition von Methanol sind die Methanolquellen der Böden. Zwar wurden Methan-oxidierende Methylo tro phe in Böden in zahlreichen Studien untersucht, über die Diversität und Nischen-definierende Parameter der Methanol-oxidierenden Methylo tro phen und über Methanoloxidationsraten ist hingegen nur wenig bekannt. Dabei können die meisten methylo tro phen Arten Methanol und nicht Methan als Substrat nutzen. In dieser Arbeit wurden daher folgende Ziele bearbeitet: a) Bestimmung von Methanoloxidationskinetiken in oxischen Böden, b) Identifizierung von Methylo tro phen, die durch *in situ* relevante Methanolkonzentrationen angeregt werden, c) Bestimmung der Strukturen der Methylo tro phen-Gemeinschaften in Böden und d) Identifizierung von Umweltparametern, die mit der Gemeinschaftsstruktur der Methylo tro phen korrelieren.

Frühere Untersuchungen zeigten, dass Methylo tro phe in Böden durch Methanolkonzentrationen im Bereich einiger Millimol pro Gramm Trockengewicht des Bodens stimuliert werden. *In situ* relevante Methanolkonzentrationen sind jedoch mindestens um den Faktor 1000 geringer. Die minimale Methanolkonzentration, bei der in dieser Doktorarbeit eine Oxidationsaktivität nachgewiesen wurde, lag bei 2 Nanomol pro Gramm Trockengewicht des Bodens. Grünlandböden haben folglich das Potenzial *in situ* relevante Methanolkonzentrationen zu oxidieren. Die spezifische Affinität der analysierten Grünlandböden-Gemeinschaften für Methanol ( $a_s^0 = 0,03 \text{ d}^{-1}$ ) war geringer als die spezifische Affinität für Methanol von Meerwasserproben, was darauf hinweisen kann, dass sich die Gemeinschaft der Methylo tro phen in Böden und Meerwasser unterscheidet. Zwei Genotypen, die durch *in situ* relevante Methanolkonzentrationen stimuliert wurden, konnten den *Alphaproteobacteria* zugeordnet werden. Die Isolierung von 129 Reinkulturen auf Medium mit Methanol und die Analyse von Genmarkern des methylo tro phen Stoffwechsels (*mxnF*, *mch*, *fae*) zeigten ferner, dass *Alphaproteobacteria* in der untersuchten Bodengemeinschaft am häufigsten vertreten waren. Insbesondere die Gattungen *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Methylobacterium*, *Starkeya*, *Methylocella* und *Methyloferula* spielten bei der Oxidation von Methanol in Böden wahrscheinlich eine Rolle. Die Lebendzellzahl von Methanol-oxidierenden Methylo tro phen lag bei  $10^6$  bis  $10^8$  pro Gramm

Trockengewicht des Bodens. 22% der Reinkulturen gehörten zu Gattungen, von denen Methylootrophie bisher nicht berichtet wurde. Darüber hinaus wurden Genotypen detektiert, die nur sehr entfernt verwandt zu bekannten Genotypen waren. Methylootrophie ist daher wahrscheinlich in mehr taxonomischen Gruppen verbreitet als bisher angenommen werden konnte. Grundsätzlich korrelierte die Gemeinschaftsstruktur der Methylootrophen mit dem Boden-pH-Wert und dem Vegetationstyp. Methylootrophe Gemeinschaften im Böden sind damit wichtige Senken im globalen Methanolhaushalt und werden vor allem durch Interaktionen mit Pflanzen und dem *in situ* pH-Wert beeinflusst.



## 6 ABSTRACT

Methanol is a climate relevant trace gas and increases the formation of tropospheric ozone. Plants are the most important sources of methanol in terrestrial ecosystems. The annual emission rate of methanol is comparable to that of methane. Methylotrophic bacteria are capable of utilization of compounds without a carbon-carbon-bond, such as methanol or methane, as a substrate, and are therefore, potential biological sinks of climate relevant compounds. It has been shown that some methylotrophs in the phyllosphere utilize Methanol, emitted by above ground plant material, and produce phytohormones that stimulate plant growth. The metabolic activity of methylotrophs in the phyllosphere might therefore cause an important sink in the global methanol cycle. Probably plants are inoculated by methylotrophs with surrounding soil. Methylotrophs in soils could also influence the global methanol cycle. Belowground plant particles and atmospheric methanol deposition are sources of soil methanol. Methane-oxidizing methylotrophs have been intensively studied, whereas, little is known about the diversity and niche-defining parameters of methanol-oxidizing bacteria and methanol oxidation rates in soils. Although most methylotrophic species are able to use methanol and not methane as a substrate. Therefore the following objectives were addressed: a) to determine methanol oxidation kinetics in oxic soils, b) to identify methylotrophs that are stimulated by *in situ* relevant methanol concentrations, c) to analyse the methylotroph community structures in soils, and d) to identify environmental parameters that correlate with the methylotroph community composition.

Previous studies revealed that methylotrophs are stimulated by methanol concentrations in the range of some millimoles per gram of soil. Likely, *in situ* relevant methanol concentrations are at least 1000fold lower. A minimal methanol concentration at which oxidation activity was detected in the current study was 2 nanomoles per gram dry weight of soil. Thus, grassland soil has the potential to oxidize *in situ* relevant methanol concentrations. The specific affinity of the analyzed grassland soils to methanol ( $a_s^0 = 0.03 \text{ d}^{-1}$ ) was lower than the specific affinity of samples from surface seawater, which suggests that methylotrophic communities in soils and seawater differ and exhibit different enzymatic properties. Two genotypes that were stimulated by *in situ* relevant methanol concentrations were next-related to genotypes of *Alphaproteobacteria*. An isolation-based survey (129 pure cultures) on methanol-containing media and the analysis of methylotroph communities based on gene markers of the methylotrophic metabolism (*mxnF*, *mch*, *fae*) revealed that *Alphaproteobacteria* was the dominating phylum in all investigated soil communities. Particularly, *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Methylobacterium*, *Starkeya*, *Methylocella*, and *Methyloferula* were likely important for methanol oxidation in aerated temperate soils. Numbers of cultivable cells ranged from  $10^6$  to  $10^8$  cells per gram dry weight of soil. 22% of the isolates belonged to genera, of which methylotrophy has not been reported before. Furthermore, various genotypes were only distantly related to known sequences. Likely, methylotrophy is taxonomically more widespread than previously thought. The methylotrophic community composition correlated with soil-pH and vegetation type. Methylotroph communities in oxic soils are important sinks

in the global methanol budget and are mainly affected by interactions with plants and *in situ* pH.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

**Abanda-Nkpwatt, D., Müsch, M., Tschiersch, J., Boettner, M., Schwab, W.** (2006) Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: Growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. *J Exp Bot.* 57, 4025-4032.

**Abraham W.-R., Strömpl, C., Meyer, H., Lindholst, S., Moore, E. R., Christ, R., Vancanneyt, M., Tindall, B. J., Bennisar, A., Smit, J., Tesar, M.** (1999) Phylogeny and polyphasic taxonomy of *Caulobacter* species. Proposal of *Maricaulis* gen nov., with *Maricaulis maris* (Poindexter) comb. nov., as the type species, and emended description of the genera *Brevundimonas* and *Caulobacter*. *Int J Syst Bacteriol.* 49, 1053-1073.

**Achouak, W., Sutra, L., Heulin, T., Meyer, J. M., Fromin, N., Degraeve, S., Christen, R., Gardan, L.** (2000) *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 50, 9-18.

**Ainsworth, E. A., Yendrek, C. R., Sitch, S., Collins, W. J., Emberson, L. D.** (2012) The effects of tropospheric ozone on net primary productivity and implications for climate change. *Annu Rev Plant Biol.* 63, 637-661.

**Al-Awadhi, N., Egli, T., Hamer, G.** (1988) Growth characteristics of a thermotolerant methylotrophic *Bacillus* sp. (NCIB 12522) in batch culture. *Appl Microbiol Biotechnol.* 29, 485-493.

**Alef, K.** (1991) Methodenhandbuch der Bodenmikrobiologie: Aktivitäten, Biomasse, Differenzierung. Ecomed. Landsberg/Lech.

**Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J.** (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215, 403-410.

**Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H.** (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* 59, 143–169.

**Anda, M., Ikeda, S., Eda, S., Okubo, T., Sato, S., Tabata, S., Mitsui, H., Minamisawa, K.** (2011) Isolation and genetic characterization of *Aurantimonas* and *Methylobacterium* strains from stems of hypernodulated soybeans. *Microbes Environ.* 26, 172-180.

**Ander, P., Eriksson, M. E. R., Eriksson, K., -E.** (1985) Methanol production from lignin-related substances by *Phanerochaete chrysosporium*. *Physiol Plant.* 65, 317-321.

**Anesti, V., McDonald, I. R., Ramaswamy, M., Wade, W. G., Kelly, D. P., Wood, A. P.** (2005) Isolation and molecular detection of methylotrophic bacteria occurring in the human mouth. *Environ Microbiol.* 7, 1227-1238.

**Anthony, C.** (1982) The biochemistry of methylotrophs. Academic Press. London, UK.

**Anthony, C.** (2004) The quinoprotein dehydrogenase for methanol and glucose. *Arch Biochem Biophys.* 428, 2-9.

**Anthony, C. und Williams, P.** (2003) The structure and mechanism of methanol dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta.* 1647, 18-23.

**Antony, C. P., Doronina, N. V., Boden, R., Trotsenko, Y. A., Shouche, Y. S., Murrell, J. C.** (2012) *Methylophaga lonarensis* sp. nov., a moderately haloalkaliphilic methylotroph isolated from the soda lake sediments of a meteorite impact crater. *Int J Syst Evol Microbiol.* 62, 1613-1618.

**Arfman, N., Beeumen, J. V., De Vries, G. E., Harder, W., Dijkhuizen, L.** (1991) Purification and characterization of an activator protein for methanol dehydrogenase from thermotolerant *Bacillus* spp. *J Biol Chem.* 266, 3955-3960.

**Arfman, N., Hektor, H. J., Bystrykh, L. V., Govorukhina, N. I., Dijkhuizen, L., Frank, J.** (1997) Properties of a NAD(H)-containing methanol dehydrogenase and its activator protein from *Bacillus methanolicus*. *Eur J Biochem.* 244, 426-433.

**Arfman, N., Watling, E. M., Clement, W., van Oosterwijk, R. J., de Vries, G. E., Harder, W., Attwood M. M., Dijkhuizen, L.** (1989) Methanol metabolism in thermotolerant *Bacillus* strains involving a novel catabolic NAD-dependent methanol dehydrogenase as a key enzyme. *Arch Microbiol.* 152, 280-288.

**Asensio, D., Peñuelas, J., Filella, I., Llusà, J.** (2007) On-line screening of soil VOCs exchange responses to moisture, temperature and root presence. *Plant Soil.* 291, 249-261.

**Atkinson, R. und Arey, J.** (2003) Gas-phase tropospheric chemistry of biogenic volatile organic compounds: A review. *Atmos Environ.* 37, 197-219.

**Atlas, R. M.** (1993) Handbook of microbiological media. CRC Press. London, UK.

**Atlas, R. M.** (2005) Handbook of media for environmental microbiology. 2. Auflage. CRC Press. London, UK.

**Bååth, E. und Anderson, T. -H.** (2003) Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. *Soil Biol Biochem.* 35, 955-963.

**Bae, J. Y., Kim, K. Y., Kim, J. H., Lee, K., Cho, J. C., Cha, C. J.** (2010) *Paenibacillus aestuarii* sp. nov., isolated from an estuarine wetland. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60, 644-647.

**Baïda, N., Yazourh, A., Singer, E., Izard, D.** (2001) *Pseudomonas brenneri* sp. nov., a new species isolated from natural mineral waters. *Res Microbiol.* 152, 493-502.

**Baldani, J. I., Baldani, V. L. D., Seldin, L., Döbereiner, J.** (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int J Syst Bacteriol.* 36, 86-93.

**Balk, M., Weijma, J., Friedrich, M. W., Stams, A. J. M.** (2003) Methanol utilization by a novel thermophilic homoacetogenic bacterium, *Moorella mulderi* sp. nov., isolated from a bioreactor. *Arch Microbiol.* 179, 315–320.

**Bamforth, C. W. und Quayle, J. R.** (1978) Aerobic and anaerobic growth of *Paracoccus denitrificans* on methanol. *Arch Microbiol.* 119, 91-97.

**Bannert, A., Bogen, C., Esperschütz, J., Koubová, A., Buegger, F., Fischer D., Radl, V., Fuß, R., Chroňáková, A., Elhottová, D., Šimek, M., Schlöter, M.** (2012) Anaerobic oxidation of methane in grassland soils used for cattle husbandry. *Biogeosci Discuss.* 9, 4919-4945.

**Barber, R. D. und Donohue, T. J.** (1998) Function of a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase in *Rhodobacter sphaeroides* formaldehyde oxidation and assimilation. *Biochemistry.* 37, 530–537.

**Barbier, B. A., Dziduch, I., Liebner, S., Ganzert, L., Lantuit, H., Pollard, W., Wagner, D.** (2012) Methane-cycling communities in a permafrost-affected soil on Herschel Island, Western Canadian Arctic: Active layer profiling of *mcrA* und *pmoA* genes. *FEMS Microbiol Ecol.* 82, 287-302.

**Bärlocher, F.** (2008) Biostatistik: Praktische Einführung in Konzepte und Methoden. 2. Auflage. Thieme. Stuttgart.

**Battistuzzi, F. U., Feijao, A., Hedges, S. B.** (2004) A genomic timescale of prokaryotic evolution insights into the origin of methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land. *BMC Evol Biol.* 4, 44.

**Bell, S. C. und Turner, J. M.** (1973) Iodinin biosynthesis by a pseudomonad. *Biochem Soc Transact.* 1, 751-753.

**Berry, D., Mahfoudh, B. K., Wagner, M., Loy, A.** (2011) Barcoded primers used in multiplex amplicon pyrosequencing bias amplification. *Appl Environ Microbiol.* 77, 7846-7849.

**Birkhofer, K., Schöning, I., Alt, F., Herold, N., Klärner, B., Maraun, M., Marhan, S., Oelmann, Y., Wubet, T., Yurkov, A., Begerow, D., Berner, D., Buscot, F., Daniel, R., Diekötter, T., Ehnes, R.B., Erdmann, G., Fischer, C., Foessel, B., Groh, J., Gutknecht, J., Kandeler, E., Lang, C., Lohaus, G., Meyer, A., Nacke, H., Nähter, A., Overmann, J., Polle, A., Pollierer, M.M., Scheu, S., Schlöter, M., Schulze, E. -D., Schulze, W., Weinert, J., Weisser, W. W., Wolters, V., Schrumpf, M.** (2012) General relationships between abiotic soil properties and soil biota across spatial scales and different land-use types. *PLoS One.* 7: e43292. Online verfügbar. doi: 10.1371/journal.pone.0043292.

**Blume, H. P., Brümmer, G. W., Horn, R., Kandeler, E., Kögel-Knabner, I., Kretzschmar, R., Stahr, K., Wilke, M.B.** (2010) Scheffer/Schachtschnabel: Lehrbuch der Bodenkunde. 16. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg.

**Bodelier, P. L. E. und Laanbroek, H. J.** (2004) Nitrogen as a regulatory factor of methane oxidation in soils and sediments. *FEMS Microbiol Ecol.* 47, 265-277.

**Boden, R., Ferriera, S., Johnson, J., Kelly, D. P., Murrell, J. C., Schäfer, H.** (2011) Draft genome sequence of the chemolithoheterotrophic, halophilic methylotroph *Methylophaga thiooxydans* DMS010. *J Bacteriol.* 193, 3154–3155.

**Boden, R., Kelly, D. P., Murrell, J. C., Schäfer, H.** (2010) Oxidation of dimethylsulfide to tetrathionate by *Methylophaga thiooxydans* sp. nov.: A new link in the sulfur cycle. *Environ Microbiol.* 12, 2688-2699.

**Boden, R., Thomas, E., Savani, P., Donovan, P. K., Wood, A. P.** (2008) Novel methylotrophic bacteria isolated from the river Thames (London, UK). *Environ Microbiol.* 10, 3225-3236.

**Bojalil, L. F., Cerbon, J., Trujillo, A.** (1962) Adansonian classification of *Mycobacteria*. *J Gen Microbiol.* 28, 333-346.

**Börjesson, G. und Nohrstedt, H. -Ö.** (2000) Fast recovery of atmospheric methane consumption in a Swedish forest soil after single-shot N-fertilization. *Forest Ecol Manage.* 134, 83-88.

**Borodina, E.; Kelly, D. P., Schumann, P., Rainey, F. A., Ward-Rainey, N. L., Wood, A. P.** (2002) Enzymes of dimethylsulfone metabolism and the phylogenetic characterization of the facultative methylotrophs *Arthobacter sulfonivorans* sp.nov., *Arthobacter methylotrophus* sp. nov., and *Hyphomicrobium sulfonivorans* sp. nov. *Arch Microbiol.* 177, 173-183.

**Bowman J.** (2000) The Methanotrophs. The families *Methylococcaceae* and *Methylocystaceae*. *Prokaryotes.* 5, 266-289.

**Brautaset, T., Jakobsen, Ø. M., Flickinger, M. C., Valla, S., Ellingsen, T. E.** (2004) Plasmid-dependent methylotrophy in thermotolerant *Bacillus methanolicus*. *J Bacteriol.* 186, 1229-1238.

**Brocks J. J., Buick. R., Summons. R. E., Logan, G. A.** (2003) A reconstruction of archaean biological diversity based on molecular fossils from the 2.78 to 2.45 billion year old Mount Bruce Supergroup, Hammersley Basin, Western Australia. *Geochim Cosmochim Acta.* 67, 4321-4335.

**Broda, P., Birch, P. R., Brooks, P. R., Sims, P. F.** (1996) Lignocellulose degradation by *Phanerochaete chrysosporium*: Gene families and gene expression for a complex process. *Mol Microbiol.* 19, 923-932.

**Bunge, M., Araghipour, N., Mikoviny, T., Dunkl, J., Schnitzhofer, R., Hansel, A., Schinner, F., Wisthaler, A., Margesin, R., Märk, T. D.** (2008) On-line monitoring of microbial volatile metabolites by proton transfer reaction-mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol.* 74, 2179-2186.

**Button, D. K.** (1998) Nutrient uptake by microorganisms according to kinetic parameters from theory as related to cytoarchitecture. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62, 636-645.

**Bystrykh, L. V., Vonck, J., Van Bruggen, E. F. J., Van Beeumen, J., Samyn, B., Govorukhina, N. I., Arfman, N., Duine, J. A., Dijkhuizen, L.** (1993) Electron microscopic analysis and structural characterization of novel NADP(H)-containing methanol: N,N'-dimethyl-4-nitrosoaniline oxidoreductases from the gram-positive methylotrophic bacteria *Amycolatopsis methanolica* and *Mycobacterium gastri* MB19. *J Bacteriol.* 175, 1814-1822.

**Cao, Y. R., Wang, Q., Jin, R. X., Tang, S. K., Jiang, Y., He, W. X., Lai, H. X., Xu, L. H., Jiang, C. L.** (2011) *Methylobacterium soli* sp. nov. a methanol-utilizing bacterium isolated from the forest soil. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 99, 629-634.

**Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Peña, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knight, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J. R., Turnbaugh, P. J., Walters, W. A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R.** (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 7, 335-336.

**Chain, P. S., Deneff, V. J., Konstantinidis, K. T., Vergez, L. M., Agulló, L., Reyes, V. L., Hauser, L., Córdova, M., Gómez, L., González, M., Land, M., Lao, V., Larimer, F., LiPuma, J. J., Mahenthiralingam, E., Malfatti, S. A., Marx, C. J., Parnell, J. J., Ramette, A., Richardson, P., Seeger, M., Smith, D., Spilker, T., Sul, W. J., Tsoi, T. V., Ulrich, L. E., Zhulin, I. B., Tiedje, J. M.** (2006) *Burkholderia xenovorans* LB400 harbors a multi-replicon, 9.73-Mbp genome shaped for versatility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103, 15280-15287.

**Chang, C. -Y., Tung, H. -H., Tseng, I.-C., Wu, J. -H, Liu, Y. -F., Lin, H. -M.** (2010) Dynamics of methanotrophic communities in tropical alkaline landfill upland soil. *Appl Soil Ecol*. 46, 192-199.

**Chao, A.** (1984) Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scand J Stat*. 11, 265-270.

**Chatwin T.D.** (1989) Cyanide attenuation/degradation in soil. Resource recovery and conservation company (R<sup>2</sup>C<sup>2</sup>). Salt Lake City, UT.

**Chistoserdova, L.** (2011) Modularity of methylotrophy, revisited. *Environ Microbiol*. 13, 2603-2622.

**Chistoserdova, L. und Lidstrom, M. E.** (1997) Molecular and mutational analysis of a DNA region separating two methylotrophy gene clusters in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Microbiology*. 143, 1729-1736.

**Chistoserdova, L., Gomelsky, L., Vorholt, J. A., Gomelsky, M., Tsygankov, Y. D., Lidstrom, M. E.** (2000) Analysis of two formaldehyde oxidation pathways in *Methylobacillus flagellatus* KT, a ribulose monophosphate cycle methylotroph. *Microbiology*. 146, 233-238.

**Chistoserdova, L., Jenkins, C., Kalyuzhnaya, M., Marx, C. J., Lapidus, A., Vorholt, J. A., Staley, J. T., Lidstrom, M. E.** (2004) The enigmatic *Planctomycetes* may hold a key to the origins of methanogenesis and methylotrophy. *Mol Biol Evol*. 21, 1234-1241.

**Chistoserdova, L., Kalyuzhnaya, M. G., Lidstrom, M. E.** (2005) C<sub>1</sub> transfer modules: From genomics to ecology. *ASM News*. 71, 521-528.



**Chistoserdova, L., Kalyuzhnaya, M. G., Lidstrom, M. E.** (2009) The expanding world of methylotrophic metabolism. *Annu Rev Microbiol.* 63, 477-499.

**Chistoserdova, L., Lapidus, A., Han, C., Goodwin, L., Saunders, L., Brettin, T., Tapia, R., Gilna, P., Lucas, S., Richardson, P. M., Lidstrom, M. E.** (2007) Genome of *Methylobacillus flagellatus*, molecular basis for obligate methylotrophy, and polyphyletic origin of methylotrophy. *J Bacteriol.* 189, 4020-4027.

**Chistoserdova, L., Vorholt, J. A., Thauer, R. K., Lidstrom, M. E.** (1998) C1 transfer enzymes and coenzymes linking methylotrophic bacteria and methanogenic archaea. *Science.* 281, 99-102.

**Chongcharoen, R., Smith, T. J., Flint, K. P., Dalton, H.** (2005) Adaptation and acclimatization to formaldehyde in methylotrophs capable of high-concentration formaldehyde detoxification. *Microbiology.* 151, 2615-2622.

**Coenye, T., Laevens, S., Willems, A., Ohlén, M., Hannant, W., Govan, J. R., Gillis, M., Falsen, E., Vandamme, P.** (2001) *Burkholderia fungorum* sp. nov. and *Burkholderia caledonica* sp. nov., two new species isolated from the environment, animals and human clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51, 1099-1107.

**Coenye, T., Goris, J., Spilker, T., Vandamme, P., LiPuma, J. J.** (2002) Characterization of unusual bacteria isolated from respiratory secretions of cystic fibrosis patients and description of *Inquilinus limosus* gen. nov., sp. nov. *J Clin Microbiol.* 40, 2062-2069.

**Colwell, R. K. und Coddington, J. A.** (1994) Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 345, 101-118.

**Conrad, R.** (2009) The global methane cycle: Recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environ Microbiol Rep.* 1, 285-292.

**Conrad, R. und Claus, P.** (2005) Contribution of methanol to the production of methane and its <sup>13</sup>C-isotopic signature in anoxic rice field soil. *Biogeochem.* 73, 381-393.

**Cossins, E. A.** (1964) The utilization of carbon-1 compounds by plants: I. The metabolism of methanol-C<sup>14</sup> and its role in amino acid biosynthesis. *Can J Biochem.* 42, 1793-1802.

**Cousin, S., Päuker, O., Stackebrandt, E.** (2007) *Flavobacterium aquidurens* sp. nov. and *Flavobacterium hercynium* sp. nov., from a hard-water creek. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57, 243-249.

**Csonka, L. N.** (1989) Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol Rev.* 53, 121-147.

**Dalton, H. und Whittenbury, R.** (1976) The acetylene reduction technique as an assay for nitrogenase activity in the methane oxidizing bacterium *Methylococcus capsulatus* strain Bath. *Arch Microbiol.* 109, 147-151.

**Danilova, O. V., Kulichevskaya, I. S., Rozova, O. N., Detkova, E. N., Bodelier, P. L., Trotsenko, Y. A., Dedysh, S. N.** (2012) *Methylomonas paludis* sp. nov., the first acid-tolerant member of the genus *Methylomonas*, from an acidic wetland. *Int J Syst Evol Microbiol.* Online verfügbar. doi: 10.1099/ijs.0.045658-0.

**De Boer, W., Leveau, J. H., Kowalchuk, G. A., Klein Gunnewiek, P. J., Abeln, E. C., Figge, M. J., Sjollem, K., Janse, J. D., van Veen, J. A.** (2004) *Collimonas fungivorans* gen. nov., sp. nov., a chitinolytic soil bacterium with the ability to grow on living fungal hyphae. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54, 857-864.

**De Gouw, J. und Warneke, C.** (2007) Measurement of volatile organic compounds in the earth's atmosphere using proton-transfer-reaction mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* 26, 223-257.

**De Man, J. C.** (1975) The probability of most probable numbers. *Eur J Appl Microbiol.* 1, 67-78.

**De Man, J. C.** (1977) MPN tables for more than one test. , 307–316.

**De Marco, P.** (2004) Methyлотrophy versus heterotrophy: a misconception. *Microbiology*, 150, 1606-1607.

**De Zwart, J. M. M., Nelisse, P. N., Kuenen, J. G.** (1996) Isolation and characterization of *Methylophaga sulfidovorans* sp. nov.: An obligately methyлотrophic, aerobic, dimethylsulfide oxidizing bacterium from microbial mat. *FEMS Microbiol Ecol.* 20, 261-270.

**Deboer, L., Dijkhuizen, L., Grobbs, G., Goodfellow, M., Stackebrandt, E., Parlett, J. H., Whitehead, D., Witt, D.** (1990) *Amycolatopsis methanolica* sp. nov., a facultatively methyлотrophic Actinomycete. *Int J Syst Bacteriol.* 40, 194-204.

**Dedysh, S. N., Berestovskaya, Y. Y., Vasylieva, L. V., Belova, S. E., Khmelenina, V. N., Suzina, N. E., Trotsenko, Y. A., Liesack, W., Zavazin, G. A.** (2004 a) *Methylocella tundrae* sp. nov., a novel methanotrophic bacterium from acidic tundra peatlands. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54, 151-156.

**Dedysh, S. N., Khmelenina, V. N., Suzina, N. E., Trotsenko, Y. A., Semrau, J. D., Liesack, W. Tiedje, J. M.** (2002) *Methylocapsa acidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel methane-oxidizing and dinitrogen-fixing acidophilic bacterium from Sphagnum bog. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52, 251-261.

**Dedysh, S. N., Panikov, N. S., Liesack, W., Grosskopf, R., Zhou, J. Z., Tiedje, J. M.** (1998). Isolation of acidophilic methane-oxidizing bacteria from northern peat wetlands. *Science.* 282, 281-284.

**Dedysh, S. N., Ricke, P., Liesack, W.** (2004 b) NifH and NifD phylogenies: An evolutionary basis for understanding nitrogen fixation capabilities of methanotrophic bacteria. *Microbiology.* 150, 1301-1313.

**Delmotte, N., Knief, C., Chaffron, S., Innerebner, G., Roschitzki, B., Schlapbach, R., von Mering, C., Vorholt, J. A.** (2009) Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 16428-16433.

**Denef, V. J., Patrauchan, M. A., Florizone, C., Park, J., Tsoi, T. V., Verstraete, W., Tiedje, J. M., Eltis, L. D.** (2005) Growth substrate- and phase-specific expression of biphenyl, benzoate, and C1 metabolic pathways in *Burkholderia xenovorans* LB400. *J Bacteriol.* 187, 7996-8005.

**Dengelmann, D. M., Borken, W., Drake, H. L., Kolb, S.** (2010) Different atmospheric methane-oxidizing communities in European beech and Norway spruce soils. *Appl Environ Microbiol.* 76, 3228-3235.

**Denner, E. B., Smith, G. W., Busse, H. J., Schumann, P., Narzt, T., Polson, S. W., Lubitz, S.W., Richardson, L. L.** (2003) *Aurantimonas coralicida* gen nov, sp nov., the causative agent of white plaque type II on caribbean scleractinian corals. *Int J Syst Evol Microbiol.* 53, 1115-1122.

**Dijkstra, M., Frank, J., Duine, J. A.** (1989) Studies on electron transfer from methanol dehydrogenase to cytochrome  $c_L$ , both purified from *Hyphomicrobium* X. *Biochem J.* 257, 87-94.

**Dixon, J. L., Beale, R., Nightingale, P. D.** (2011) Microbial methanol uptake in northeast Atlantic waters. *ISME J.* 5, 704-716.

**Dong, Y., Scharffe, D., Lobert, J. M., Crutzen, P. J., Sanhueza, E.** (1998) Fluxes of CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O from a temperate forest soil: The effects of leaves and humus layers. *Tellus.* 50B, 243-252.

**Doronina, N. V., Darmaeva, T. D., Trotsenko, Y. A. (2003)** *Methylophaga alcalica* sp. nov., a novel alkaliphilic and moderately halophilic, obligately methylotrophic bacterium from an East Mongolian saline soda lake. *Int J Syst Evol Microbiol.* 53, 223-229.

**Doronina, N. V., Gogleva, A. A., Trotsenko, Y. A. (2012 a)** *Methylophilus glucosoxydans* sp. nov., a restricted facultative methylotroph from rice rhizosphere. *Int J Syst Evol Microbiol.* 62, 196-201.

**Doronina, N. V., Kaparullina, E. N., Bykova, T. V., Trotsenko, Y. A. (2012 b)** *Methylopila musalis* sp. nov., a new aerobic facultatively methylotrophic bacterium isolated from banana fruit. *Int J Syst Evol Microbiol.* Online verfügbar. doi: 10.1099/ijls.0.042028-0.

**Doronina, N. V., Kaparullina, E. N., Trotsenko, Y. A. (2011)** *Methylovorus menthalis*, a novel species of aerobic obligate methylobacteria associated with plants. *Microbiology.* 80, 713-719.

**Dufrêne, M. und Legendre, P. (1997)** Species assemblages and indicator species: The need for a flexible asymmetrical approach. *Ecol Monogr.* 67, 345–366.

**Dunfield, P und Knowles, R. (1995)** Kinetics of inhibition of methane oxidation by nitrate, nitrite, and ammonium in a humisol. *Appl Environ Microbiol.* 61, 3129-3135.

**Dunfield, P. F., Belova, S. E., Vorob'ev, A. V., Cornish, S. L., Dedysh, S. N. (2010)** *Methylocapsa aurea* sp. nov., a facultative methanotroph possessing a particulate methane monooxygenase, and emended description of the genus *Methylocapsa*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60, 2659-2664.

**Dunfield, P. F. und Knowels, R. (1995)** Kinetics of inhibition of methane oxidation by nitrite, nitrate and ammonium oxidation in a humisol. *Appl Environ Microbiol.* 61, 3129-3135.

**Dunfield, P. F., Yuryev, A., Senin, P., Smirnova, A. V., Stott, M. B., Hou, S. B., Ly, B., Saw, J. H., Zhou, Z., , Ren, Y., Wang, J., Mountain, B. W., Crowe, M. A., Weatherby, T. M., Bodelier, P. L., Liesack, W., Feng, L., Wang, L., Alam, M. (2007)** Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum *Verrucomicrobia*, *Nature.* 450, 879-882.

**Dunfield, P.F. (2007)** The soil methane sink. In: Reay, D. S., Hewitt, N., Smith, K. A., Grace, J. (Hrsg.) *Greenhouse Gas Sinks.* CABI Publishing. Wallingford, US.

**Ebertsch, L. (2009)** Methanol-oxidierende Mikroorganismen in belüfteten Böden. Lehrstuhl für ökologische Mikrobiologie, Universität Bayreuth. Bachelorarbeit.

**Egert, M. und Friedrich, M. W.** (2003) Formation of pseudo-terminal restriction fragments, a PCR-related bias affecting terminal restriction fragment length polymorphism analysis of microbial community structure. *Appl Environ Microbiol.* 69, 2555-2562.

**Eller, G., Krüger, M., Frenzel, P.** (2005) Comparing field and microcosm experiments: A case study on methano- and methylotrophic bacteria in paddy soil. *FEMS Microbiol Ecol.* 51, 279-291.

**Ellsworth, D. L., Rittenhouse, K. D., Honeycutt, R. L.** (1993) Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Biotechniques.* 14, 214-217.

**Erb, T. J., Berg, I. A., Brecht, V., Müller, M., Fuchs, G., Alber, B.E.** (2007) Synthesis of C<sub>5</sub>-dicarboxylic acids from C<sub>2</sub>-units involving crotonyl-CoA carboxylase/reductase: The ethylmalonyl-CoA pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 10631-10636.

**Ettwig, K. F., Butler, M. K., Le Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M. M., Schreiber, F., Dutilh, B. E., Zedelius, J., de Beer, D., Gloerich, J., Wessels, H. J., van Alen, T., Luesken, F., Wu, M. L., van de Pas-Schoonen, K. T., Op den Camp, H. J., Janssen-Megens, E. M., Francoijs, K. J., Stunnenberg, H., Weissenbach, J., Jetten, M. S., Strous, M.** (2010) Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature.* 464, 543-548.

**Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C., Green, P.** (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8, 175-185.

**Exploratorien zur funktionellen Biodiversitätsforschung** (2011 a) URL: <http://www.biodiversity-exploratories.de/exploratorien/schwaebische-alb/gebiet>. Aufgerufen am 04.01.2013.

**Exploratorien zur funktionellen Biodiversitätsforschung** (2011 b) URL: <http://www.biodiversity-exploratories.de/exploratorien/schwaebische-alb/flaechen>. Aufgerufen am 04.01.2013.

**Exploratorien zur funktionellen Biodiversitätsforschung** (2011 c) URL: <http://www.biodiversity-exploratories.de/exploratorien/hainich-duen/gebiet>. Aufgerufen am 04.01.2013.

**Exploratorien zur funktionellen Biodiversitätsforschung** (2011 d) URL: <http://www.biodiversity-exploratories.de/exploratorien/schorfheide/gebietsbeschreibung>. Aufgerufen am 04.01.2013.

**Exploratorien zur funktionellen Biodiversitätsforschung** (2011 e) URL: <http://www.biodiversity-exploratories.de/exploratorien/schorfheide/flaechen>). Aufgerufen am 04.01.2013.

**Fall, R., Benson, A. A.** (1996) Leaf methanol- the simplest natural product from plants. Trends Plant Sci. 1, 296-301.

**Farley, R.A. und Fitter, A. H.** (1999) Temporal and spatial variation in soil resources in a deciduous woodland. J Ecol. 87, 688-696.

**Feldman, M. Y.** (1973) Reactions of nucleic acids and nucleoproteins with formaldehyde. Progr Nucleic Acid Res Mol Biol. 13, 1–49.

**Felsenstein, J.** (1985) Confidence-limits on phylogenies-an approach using the bootstrap. Evolution. 39, 783-791.

**Ferrera, I. und Reysenbach, A. -L.** (2007) Thermophiles. eLS. Online verfügbar. doi: 10.1002/9780470015902.a0000406.

**Firsova, J., Doronina, N., Lang, E., Spröer, C., Vuilleumier, S., Trotsenko, Y.** (2009) *Ancylobacter dichloromethanicus* sp. nov.-a new aerobic facultatively methylotrophic bacterium utilizing dichloromethane. Syst Appl Microbiol. 32, 227-232.

**Fischer, M., Bossdorf, O., Gockel, S., Hänsel, F., Hemp, A., Hessenmöller, D., Korte, G., Nieschulze, J., Pfeiffer, S., Prati, D., Renner, S., Schöning, I., Schuhmacher, U., Wells, K., Buscot, F., Kalko, E. V. K. V., Linsenmair, K. E., Schulze, E., Weisser, W. W.** (2010) Implementing large-scale and long-term functional biodiversity research: The Biodiversity Exploratories. Basic Appl Ecol. 11, 473-485.

**Fitriyanto, N. A., Fushimi, M., Matsunaga, M., Pertiwinigrum, A., Iwama, T., Kawai, K.** (2011) Molecular structure and gene analysis of  $Ce^{3+}$ -induced methanol dehydrogenase of *Bradyrhizobium* sp. MAFF211645. J Biosci Bioeng. 111, 613-617.

**Forster, P., Ramaswamy, V., Artaxo, P., Berntsen, T., Betts, R. , Fahey, D.W., Haywood, J., Lean, J., Lowe, D.C., Myhre, G., Nganga, J., Prinn, R., Raga, G., Schulz, M., Van Dorland, R.** (2007) Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing. In: Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B., Tignor, M., Miller, H.L. (Hrsg.) Climate Change 2007: The physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on climate change. Cambridge University Press. Cambridge, UK.

- Frenkel, C., Peters, J. S., Tieman, D. M., Tiznado, M. E., Handa, A. K.** (1998) Pectin methylesterase regulates methanol and ethanol accumulation in ripening tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit. *J Biol Chem.* 273, 4293–4295.
- Frey, B., Niklaus, P. A., Kremer, J., Lüscher, P., Zimmermann, S.** (2011) Heavy-machinery traffic impacts methane emissions as well as methanogen abundance and community structure in oxic forest soils. *Appl Environ Microbiol* 77, 6060-6068.
- Frierer, N. und Jackson, R. B.** (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 636-631.
- Frierer, N., Strickland, M. S., Liptzin, P., Bredford, M. A., Cleveland C. C.** (2009) Global patterns in belowground communities. *Ecol Lett.* 12, 1238-1249.
- Galbally, I. E. und Kirstine W.** (2002) The production of methanol by flowering plants and the global cycle of methanol. *J Atmos Chem.* 43, 195–229.
- Garrity, G. M., Bell, J. A., Lilburg, T. G.** (2004) Taxonomic outline of the Prokaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* 2. Auflage. Springer-Verlag. New York, US.
- Geiduschek, E. P. und Herskovits, T. T.** (1961) Nonaqueous solutions of DNA. Reversible and irreversible denaturation in methanol. *Arch Biochem Biophys.* 95, 114-129.
- Gelfand, D. H. und White, T. J.** (1990) Thermostable DNA polymerases. In: Innis, M.A. Gelfand, D. H. Sninsky, J. J. and White, T.J. (Hrsg.) *PCR protocols: A guide to methods and applications.* Academic Press, San Diego, US.
- Gilles, A., Meglécz, E., Pech, N., Ferreira, S., Malausa, T., Martin, J. F.** (2011) Accuracy and quality assessment of 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing. *BMC Genomics.* 12, 245.
- Giovannoni, S. J., Hayakawa, D. H., Tripp, H. J., Stingl, U., Givan, S. A., Cho, J. C., Oh, H. M., Kitner, J. B., Vergin, K. L., Rappé, M. S.** (2008) The small genome of an abundant coastal ocean methylotroph. *Environ Microbiol.* 10, 1771-1782.
- Glowik, B.** (2008) Abundanzen aerober methanoloxidierender Mikroorganismen in Wald und Grünlandböden. Lehrstuhl für ökologische Mikrobiologie, Universität Bayreuth. Bachelorarbeit.
- Gogleva, A. A., Kaparullina, E. N., Doronina, N. V., Trotsenko, Y. A.** (2011) *Methylobacillus arboreus* sp. nov., and *Methylobacillus gramineus* sp. nov., novel non-pigmented obligately methylotrophic bacteria associated with plants. *Syst Appl Microbiol.* 34, 477-481.

**Gogleva, A. A., Kaparullina, E. N., Doronina, N. V., Trotsenko, Y. A.** (2010) *Methylophilus flavus* sp. nov., and *Methylophilus luteus* sp. nov., aerobic, methylotrophic bacteria associated with plants. Int J Syst Evol Microbiol. 60, 2623-2628.

**Goldman, M.B., Groffman, P. M., Pouyat, R. V., McDonnell, M. J., Pickett, S. T. A.** (1995) CH<sub>4</sub> uptake and N availability in forest soils along an urban to rural gradient. Soil Biol Biochem. 27, 281-256.

**Goodfellow, M. und Alderson, G.** (1977) The actinomycete genus *Rhodococcus*: A home for the "rhodochrous" complex. J Gen Microbiol. 100, 99-122.

**Gottig, N., Pedrido, M. E., Méndez, M., Lombardía, E., Rovetto, A., Philippe, V., Orsaria, L., Grau, R.** (2005) The *Bacillus subtilis* SinR and RapA developmental regulators are responsible for inhibition of spore development by alcohol. J Bacteriol. 187, 2662–2672.

**Gout, E., Aubert, S., Bligny, R., Rébeillé, F., Nonomura, A. R., Benson, A. A., Douce, R.** (2000) Metabolism of methanol in plant cells. Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies. Plant Physiol. 123, 287-296.

**Green, P. N.** (2006) *Methylobacterium*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. –H. (Hrsg.) The prokaryotes. Springer-Verlag. New York, US.

**Griffiths, R. I., Whiteley, A. S., O'Donnell, A. G. , Bailey, M. J.** (2000) Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. Appl Environ Microbiol. 66, 5488–5491.

**Grigal, D. F.** (2000) Effects of extensive forest management on soil productivity. Forest Ecol Manag. 138, 167-185.

**Hagemeier, C. H., Chistoserdova, L., Lidstrom, M. E., Thauer, R. K., Vorholt, J. A.** (2000) Characterization of a second methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* AM1. Eur J Biochem. 267, 3762-3769.

**Halsey, K. H., Carter, A. E., Giovannoni, S. J.** (2012) Synergistic metabolism of a broad range of C1 compounds in the marine methylotrophic bacterium HTCC2181. Environ Microbiol. 14, 630-640.

**Hanson R. S. und Hanson T. E.** (1996) Methanotrophic bacteria. Microbiol Rev. 60, 439-471.



- Harms, N., Ras, J., Koning, S., Reijnders, W. N. M., Stouthamer, A. H., van Spanning, R. J. M.** (1996) Genetics of C1 metabolism regulation in *Paracoccus denitrificans*. In: Lidstrom, M. E., Tabita, F. R. (Hrsg.) Microbial growth on C1 compounds. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, NL.
- Hartner, F. S. und Glieder A.** (2006) Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. *Microb Cell Fact.* 5, 39.
- Hecker, K. H. und Roux, K. H.** (1996) High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *Biotechniques.* 20, 478-485.
- Heikes, B. G., Chang, W., Pilson, M. E., Swift, E., Singh, H. B., Guenther, A., Jacob D. J., Field, B. D., Fall, R., Riemer, D., Brand, L.** (2002) Atmospheric methanol budget and ocean implication. *Global Biogeochem Cy.* 16, 80-1-80-30.
- Hektor, H. J., Kloosterman, H., Dijkhuizen, L.** (2002) Identification of a magnesium-dependent NAD(P)(H)-binding domain in the nicotinoprotein methanol dehydrogenase from *Bacillus methanolicus*. *J Biol Chem.* 277, 46966-46973.
- Henckel, T., Friedrich, M., Conrad, R.** (1999) Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase. *Appl Environ Microbiol.* 65, 1980-1990.
- Henckel, T., Jäckel, U., Schnell, S., Conrad, R.** (2000) Molecular analyses of novel methanotrophic communities in forest soil that oxidize atmospheric methane. *Appl Environ Microbiol.* 66, 1801-1808.
- Hetz, S.** (2010) Saisonale Dynamiken von Genmarkern methylotropher Bacteria in belüfteten Böden. Lehrstuhl für ökologische Mikrobiologie, Universität Bayreuth. Bachelorarbeit.
- Hickman, G. T. und Novak, J. T.** (1989) Relationship between subsurface biodegradation rates and microbial density. *Environ Sci Technol.* 23, 525–532.
- Hilger, H. A., Wollum, A. G., Barlaz, M. A.** (2000) Landfill methane oxidation response to vegetation, fertilization, and liming. *J Environ Qual.* 29, 324-334.
- Hirayama, H., Suzuki, Y., Abe, M., Miyazaki, M., Makita, H., Inagaki, F., Uematsu, K., Takai, K.** (2011) *Methylothermus subterraneus* sp. nov., a moderately thermophilic methanotroph isolated from a terrestrial subsurface hot aquifer. *Int J Syst Evol Microbiol.* 61, 2646-2653.

**Hoff, K. J.** (2009) The effect of sequencing errors on metagenomic gene prediction. *BMC Genomics* 10, 520.

**Holland, M. A., Long, R. L. G., Polacco, J. C.** (2002). *Methylobacterium* spp.: Phylloplane bacteria involved in cross-talk with the plant host? In: Londow, S. E., Hecht-Poinar, E. I., Elliot, V. J. (Hrsg.) *Phyllosphere microbiology*. APS Press. St. Paul, US.

**Holmes, A. J., Costello, A., Lidstrom, M. E., Murrell, J. C.** (1995) Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionary related. *FEMS Microbiol Lett.* 132, 203-208.

**Hoppe, T., Peters, K., Schmidt, F.** (2011) *Methylobacterium bullatum* sp. nov., a methylotrophic bacterium isolated from *Funaria hygrometrica*. *Syst Appl Microbiol.* 34, 482-486.

**Horz, H. -P., Yimga, M. T., Liesack, W.** (2001) Detection of methanotroph diversity on roots of submerged rice plants by molecular retrieval of *pmoA*, *mmoX*, *mxoF*, and 16S rRNA and ribosomal DNA, including *pmoA*-based terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *Appl Environ Microbiol.* 67, 4177-4185.

**Hou, S., Makarova, K. S., Saw, J. H., Senin, P., Ly, B. V., Zhou, Z., Ren, Y., Wang, J., Galperin, M. Y., Omelchenko, M. V., Wolf, Y. I., Yutin, N., Koonin, E. V., Stott, M. B., Mountain, B. W., Crowe, M. A., Smirnova, A. V., Dunfield, P. F., Feng, L., Wang, L., Alam, M.** (2008) Complete genome sequence of the extremely acidophilic methanotroph isolate V4, *Methylacidiphilum infernorum*, a representative of the bacterial phylum *Verrucomicrobia*. *Biol Direct.* 1, 3-26.

**Huber, J. A., Welch, D. B. M., Morrison, H. G., Huse, S. M., Neal, P. R., Butterfield, D. A., Sogin, M. L.** (2007) Microbial population structures in the deep marine biosphere. *Science.* 318, 97-100.

**Huber, T., Faulkner, G., Hugenholtz, P.** (2004) Bellerophon: A program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics.* 20, 2317-2319.

**Hugenholtz, P., Goebel, B. M., Pace, N. R.** (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol.* 180, 4765–4774.

**Hung, W. L., William, G. W., Chen, Y., Kelly, D. P., Wood, A. P.** (2012) Design and evaluation of novel primers for the detection of genes encoding diverse enzymes of methylotrophy and autotrophy. *Pol J Microbiol.* 61, 11-22.

**Hutchinson, G. E.** (1957) Concluding remarks. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 22, 415-427.

**Idris, R., Kuffner, M., Bodrossy, L., Puschenreiter, M., Monchy, S., Wenzel, W. W., Sessitsch, A.** (2006) Characterization of Ni-tolerant methylobacteria associated with hyperaccumulating plant *Thlaspi geosingense* and description of *Methylobacterium geosingense* sp. nov. Syst Appl Microbiol. 29, 634-644.

**Im, W. T., Aslam, Z., Lee, M., Ten, L. N., Yang, D. C., Lee, S. T.** (2006) *Starkeya koreensis* sp. nov., isolated from rice straw. Int J Syst Evol Microbiol. 56, 2409-2414.

**Islam, T., Jensen, S., Reigstad, L. J., Larsen, O., Birkeland, N. K.** (2008) Methane oxidation at 55°C and pH 2 by a thermoacidophilic bacterium belonging to the *Verrucomicrobia* phylum. Proc Natl Acad Sci U S A. 105, 300-304.

**Iturriaga, M. H., Escartín, E. F., Beuchat, L. R., Martínez-Peniche, R.** (2003) Effect of inoculum size, relative humidity, storage temperature, and ripening stage on the attachment of *Salmonella* Montevideo to tomatoes and tomatillos. J Food Prot. 66, 1756-1761.

**Iwai, S., Chai, B., Sul, W. J., Cole, J. R., Hashsham, S. A., Tiedje, J. M.** (2010) Gene-targeted-metagenomics reveals extensive diversity of aromatic dioxygenase genes in the environment. ISME J. 4, 279-285.

**Jacob, D. J., Field, B. D., Li, Q., Blake, D. R., de Gouw, J., Warneke, C., Hansel, A., Wisthaler, A., Singh, H. B., Guenther, A.** (2005) Global budget of methanol: Constraints from atmospheric observations. J Geophys Res. 110, 1-17.

**Janssen, P. H. und Harfoot, C. G.** (1991) *Rhodopseudomonas rosea* sp. nov., a new purple nonsulfur bacterium. Int J Syst Bacteriol. 41, 26-30.

**Janssen, P. H., Yates, P. S., Grinton, B. E., Taylor, P. M., Sait, M.** (2002) Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. Appl Environ Microbiol. 68, 2391–2396.

**Janssens, I. A., Dieleman, W., Luyssaert, S., Subke, J. -A., Reichstein, M., Ceulemans, R., Ciais, P., Dolman, A. J., Grace, J., Matteucci, G., Papale, D., Piao, S. L., Schulze, E. - D., Tang, J., Law, B. E.** (2010) Reduction of forest soil respiration in response to nitrogen deposition. Nat Geosci. 3, 315-322.

**Jarvis, B. D. W., Van Berkum, P., Chen, W. X., Nour, S. M., Fernandez, M. P., Cleyet-Marel, J. C., Gillis, M.** (1997) Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. Int J Syst Bacteriol. 47, 895-898.

**Jarvis, M. C.** (1984) Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. Plant Cell Environ. 7, 153-164.

**Johansen, J. E., Binnerup, S. J., Kroer, N., Mølbak, L.** (2005) *Luteibacter rhizovicius* gen. nov., sp. nov., a yellow-pigmented *Gammaproteobacterium* isolated from the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.). Int J Syst Evol Microbiol. 55, 2285-2291.

**Johnson, R. M. und Weisrock, W. P.** (1969) *Hyphomicrobium indicum* sp. nov. (*Hyphomicrobiaceae* Douglas). Int J Syst Bacteriol. 19, 295-307.

**Jones, D. L.** (1999) Amino acid biodegradation and its potential effects on organic nitrogen capture by plants. Soil Biol Biochem. 31, 613-622.

**Jones, J. G., Bellion, E.** (1991) Methanol oxidation and assimilation in *Hansenula polymorpha*. An analysis by <sup>13</sup>C n.m.r. *in vivo*. Biochem J. 280, 471-481.

**Jourand, P., Giraud, E., Béna, G., Sy, A., Willems, A., Gillis, M., Dreyfus, B., de Lajudi, P.** (2004) *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. Int J Syst Evol Microbiol. 54, 2269-2273.

**Jourand, P., Renier, A., Rapior, S., Miana de Faria, S., Prin, Y., Galiana, A., Giraud, E., Dreyfus, B.** (2005) Role of methylotrophy during symbiosis between *Methylobacterium nodulans* and *Crotalaria podocarpa*. Mol Plant Microbe Interact. 18, 1061-1068.

**Jurado, V., Gonzales, J. M., Laiz, L., Saiz-Jimenez, C.** (2006) *Aurantimonas altamirensis* sp. nov., a member of the order *Rhizobiales* isolated from Altamira Cave. Int J Syst Evol Microbiol. 56, 2583-2585.

**Kageyama, A., Takahashi, Y., Omura, S.** (2006) *Microbacterium deminutum* sp. nov., *Microbacterium pumilum* sp. nov. and *Microbacterium aoyamense* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 56, 2113-2117.

**Kalyuzhnaya, M. G., Beck, D. A., Chistoserdova, L.** (2011) Functional metagenomics of methylotrophs. Methods Enzymol. 495, 81-98.

**Kalyuzhnaya, M. G., Beck, D. A., Vorobev, A., Smally, N., Kunkel, D. D., Lidstrom, M.E., Chistoserdova, L.** (2012) Novel methylotrophic isolates from lake sediment, description of *Methylothera versatilis* sp. nov., and emended description of the genus *Methylothera*. Int J Syst Evol Microbiol. 62, 106-111.

**Kalyuzhnaya, M. G., De Marco, P., Bowerman, S., Pacheco, C. C., Lara, J. C., Lidstrom, M. E., Chistoserdova, L.** (2006) *Methyloversatilis universalis* gen. nov., sp nov., a novel taxon within the *Betaproteobacteria* represented by three methylotrophic isolates. Int J Syst Evol Microbiol. 56, 2517-2522.

**Kalyuzhnaya, M. G., Hristova, K., Lidstrom, M. E., Chistoserdova, L.** (2008) Characterization of a novel methanol dehydrogenase in representatives of *Burkholderiales*: Implications for environmental detection of methylotrophy and evidence for convergent evolution. J Bacteriol. 190, 3817–3823.

**Kalyuzhnaya, M. G., Khmelenina, V. N., Kotelnikova S., Holmquist, L., Pedersen K., Trotsenko Y. A.** (1999) *Methylomonas scandinavica* sp. nov., a new methanotrophic psychrotrophic bacterium isolated from deep igneous rock ground water of Sweden. Syst Appl Microbiol. 22, 565-572.

**Kalyuzhnaya, M. G., Korotkova, N., Crowther, G., Marx, C. J., Lidstrom, M. E., Chistoserdova, L.** (2005 a) Analysis of gene islands involved in methanopterin-linked C<sub>1</sub>-transfer reactions reveals new functions and provides evolutionary insights. J Bacteriol. 187, 4607-4614.

**Kalyuzhnaya, M. G., Lidstrom, M. E., Chistoserdova, L.** (2004) Utility of environmental primers targeting ancient enzymes: Methylotroph detection in Lake Washington. Microb Ecol. 48, 463-472.

**Kalyuzhnaya, M. G., Nercessian, O., Lidstrom, M. E., Chistoserdova, L.** (2005 b) Development and application of polymerase chain reaction primers based on *fch* for environmental detection of methanopterin-linked C<sub>1</sub> metabolism in bacteria. Environ Microbiol. 7, 1269-1274.

**Kämpfer, P. und Rosselló-Mora, R.** (2004) The species concept for prokaryotic microorganisms-an obstacle for describing diversity? Poiesis Prax. 3, 62-72.

**Kämpfer, P., Andersson, M. A., Rainey, F. A., Kroppenstedt, R. M., Salkinoja-Salonen, M.** (1999) *Williamsia muralis* gen. nov., sp. nov., isolated from the indoor environment of a children's day care centre. Int J Syst Bacteriol. 49, 681-687.

**Kämpfer, P., Lidders, N., Falsen, E.** (2009) *Luteibacter anthropi* sp. nov., isolated from human blood, and reclassification of *Dyella yeojuensis* Kim *et al.* 2006 as *Luteibacter yeojuensis* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 59, 2884-2887.

**Kane, S. R., Chakicherla, A. Y., Chain, P. S., Schmidt, R., Shin, M. W., Legler, T. C., Scow, K. M., Larimer, F. W., Lucas, S. M., Richardson, P. M., Hristova K. R.** (2007) Whole-genome analysis of the methyl tert-butyl ether-degrading Beta-Proteobacterium *Methylibium petroleiphilum* PM1. J Bacteriol. 189, 1931-1945.

**Kaneda, T. und Roxburgh, J. M.** (1959 a) A methanol-utilizing bacterium. I. Description and nutritional requirements. Can J Microbiol. 5, 87-98.

**Kaneda, T. und Roxburgh, J. M.** (1959 b) Serine as an intermediate in the assimilation of methanol by a *Pseudomonas*. Biochim Biophys Acta. 33, 106-110.

**Kato, N., Yurimoto, H., Thauer, R. K.** (2006) The physiological role of the ribulose monophosphate pathway in bacteria and archaea. Biosci Biotechnol Biochem. 70, 10-21.

**Kato, Y., Asahara, M., Goto, K., Kasai, H., Yokota, Y.** (2008) *Methylobacterium persicinum* sp. nov., *Methylobacterium komagatae* sp. nov., *Methylobacterium brachiatum* sp. nov., *Methylobacterium tardum* sp. nov. and *Methylobacterium gregans* sp. nov., isolated from freshwater. 58, 1134-1141.

**Keith, C. S., Hoang, D. O., Barrett, B. M., Feigelman, B., Nelson, M. C., Thai, H., Baysdorfer, C.** (1993) Partial sequence analysis of 130 randomly selected maize cDNA clones. Plant Physiol. 101, 329-332.

**Kemmitt, S. J., Wrigth, D., Murphy, D. V., Jones, D. L.** (2008) Regulation of amino acid biodegradation in soil as affected by depth. Biol Fertil Soils. 44, 933–941.

**Keppler, F., Kalin, R. M., Harper, D. B., McRoberts, W. C., Hamilton, J. T. G.** (2004) Carbon isotope anomaly in the major plant C<sub>1</sub> pool and its global biogeochemical implications. Biogeosciences Discuss. 1, 393-412.

**Khadem, A. F., Pol, A., Jetten, M. S., Op den Camp, H. J.** (2010) Nitrogen fixation by the verrucomicrobial methanotroph *Methyloacidiphilum fumariolicum* SolV. Microbiology. 156, 1052-1059.

**Kim, M., Morrison, M., Yu, Z.** (2011) Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. J Microbiol Methods. 84, 81-87.

**Kinghorn, A. D. und Smolenski, S. J.** (1981) Alkaloids of Papilionoideae. In: Polhill, R. M., Raven, P. H. (Hrsg.) Advances in legume systematics, Part 2. Royal Botanic Gardens. Kew, UK.

**Knief, C. und Dunfield, P.F.** (2005) Response and adaptation of different methanotrophic bacteria in methane mixing ratios. *Environ Microbiol.* 7, 1307-1317.

**Knief, C., Dengler, V., Bodelier, P. L., Vorholt, J. A.** (2012) Characterization of *Methylobacterium* strains isolated from the phyllosphere and description of *Methylobacterium longum* sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 101, 169-183.

**Knief, C., Kolb, S., Bodelier, P. L., Lipski, A., Dunfield, P. F.** (2006) The active methanotrophic community in hydromorphic soils changes in response to changing methane concentration. *Environ Microbiol.* 8, 321-333.

**Knief, C., Lipski, A., Dunfield, P. F.** (2003) Diversity and activity of methanotrophic bacteria in different upland soils. *Appl Environ Microbiol.* 69, 6703-6714.

**Knief, C., Ramette, A., Frances, L., Alonso-Blanco C., Vorholt, J. A.** (2010) Site and plant species are important determinants of *Methylobacterium* community composition in the plant phyllosphere. *ISME J.* 4, 719-728.

**Kolb, S.** (2009 a) Aerobic methanol-oxidizing bacteria in soil. *FEMS Microbiol Lett.* 300, 1-10.

**Kolb, S.** (2009 b) The quest for atmospheric methane oxidizers in forest soils. *Environ Microbiol Rep.* 1, 336-346.

**Krekeler, D. und Cypionka, H.** (1995) The preferred electron acceptor of *Desulfovibrio desulfuricans* CSN. *FEMS Microbiol Ecol.* 17, 271-278.

**Krog, A., Heggeset, T. M., Müller, J. E., Kupper, C. E., Schneider, O., Vorholt, J. A., Ellingsen, T. E., Brautaset, T.** (2013) Methylophilic *Bacillus methanolicus* encodes two chromosomal and one plasmid born NAD(+) dependent methanol dehydrogenase paralogs with different catalytic and biochemical properties. *PLoS One.* 8(3):e59188. Online verfügbar. doi: 10.1371/journal.pone.0059188.

**Krulwich, T. A., Sachs, G., Padan, E.** (2011) Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nat Rev Microbiol* 9, 330-343.

**Kumar, S., Dudley, J., Nei, M., Tamura, K.** (2008) MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform.* 9, 299-306.

**Kunin, V., Engelbrektson, A., Ochman, H., Hugenholtz, P.** (2010) Wrinkles in the rare biosphere: Pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environ Microbiol.* 12, 118-123.

**Lagas, P., Loch, J. P. G., Harmsen, K.** (1982) The behavior of cyanide in a landfill and the soil beneath it. In: Perry, R. (Hrsg.) Effects of Waste disposal on groundwater and surface water. International association of hydrological sciences. Paris, FR.

**Lampert, N.** (2011) Substrate concentration as a niche-defining factor for methanol-oxidizing bacteria. Lehrstuhl für ökologische Mikrobiologie, Universität Bayreuth. Bachelorarbeit.

**Lane, D. J.** (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Hrsg.) Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons. Chichester, UK.

**Lang, E., Swiderski, J., Stackebrandt, E., Schumann, P., Spröer, C., Sahin, N.** (2008) Description of *Ancylobacter oerskovii* sp. nov. and two additional strains of *Ancylobacter polymorphus*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58, 1997-2002.

**Lauber, C. L., Strickland, M. S., Bradford, M. A., Fierer, N.** (2008) The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biol Biochem* 40, 2407–2415.

**Lawrence, A. J. und Quayle, J. R.** (1970) Alternative carbon assimilation pathways in methane-utilizing bacteria. *J Gen Microbiol.* 63, 371-374.

**Lee, E. H., Kim, J., Cho, K. S., Ahn, Y. G., Hwang, G. S.** (2010 b) Degradation of hexane and other recalcitrant hydrocarbons by a novel isolate, *Rhodococcus* sp. EH831. *Environ Sci Pollut Res Int.* 17, 64-77.

**Lee, S. B., Crouse, C. A., Kline, M. C.** (2010 a) Optimizing storage and handling of DNA extracts. *Forensic Sci Rev.* 22, 131-144.

**Leyer, I. und Wesche, K.** (2007) Multivariate Statistik in der Ökologie. Springer. Berlin.

**LGC Genomics** (2013) URL: <http://www.lgcgenomics.com/roche-454>. Aufgerufen am 01.01.2013.

**Li, L., Zheng, J. W., Hang, B. J., Doronina, N. V., Trotsenko, Y. A., He, J., Li, S. P.** (2011) *Methylopila jiangsuensis* sp. nov., an aerobic, facultatively methylotrophic bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.* 61, 1561-1566.



- Lidstrom, M. E.** (2006) Aerobic methylotrophic prokaryotes. In: Balows, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K. -H. (Hrsg.) The prokaryotes. Springer-Verlag. New York, US.
- Ling, J., Zhang, G., Sun, H., Fan, Y., Ju, J., Zhang, C.** (2011) Isolation and characterization of a novel pyrene-degrading *Bacillus vallismortis* strain JY3A. Sci Total Environ. 409, 1994-2000.
- Liptzin, D.; Silver, W., Detto, M.** (2011) Temporal dynamics in soil oxygen and greenhouse gases in two humid tropical forests. Ecosystems. 14, 171-182.
- Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H., Forney, L. J.** (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. Appl Environ Microbiol. 63, 4516–4522.
- Liu, Y. J., Liu, S. J., Drake, H. L., Horn, M. A.** (2011) *Alphaproteobacteria* dominate active 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid herbicide degraders in agricultural soil and drilosphere. Environ Microbiol. 13, 991-1009.
- Loew, O.** (1892) Ueber einen Bacillus, welcher Ameisensäure und Formaldehyd assimilieren kann. Centralbl Bakteriol. 12, 462–465.
- Lottspeich, F. und Engels, J. W.** (2006) Bioanalytik. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, München.
- Lücke, C. und Frenzel, P.** (2011) Potential of *pmoA* amplicon pyrosequencing for methanotroph diversity studies. Appl Environ Microbiol. 77, 6305-6309.
- Macinelli, R. L.** (1995) The regulation of methane oxidation in soil. Annu Rev Microbiol. 49, 581-605.
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Kwon, S. W., Sa, T. M.** (2009 a) *Methylobacterium phyllosphaerae* sp. nov., a pink-pigmented, facultative methylotroph from the phyllosphere of rice. Int J Syst Evol Microbiol. 59, 22-27.
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Kwon, S. W., Sa, T. M.** (2009 b) *Methylophilus rhizosphaerae* sp. nov., a restricted facultative methylotroph isolated from rice rhizosphere soil. Int J Syst Evol Microbiol. 59, 2904-2908.
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Lee, J. S., Lee, K. C., Sundaram, S.** (2010) *Flavobacterium glycines* sp. nov., a facultative methylotroph isolated from the rhizosphere of soybean. Int J Syst Evol Microbiol. 60, 2187-2192.

**Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Senthilkumar, M., Lee, J. S., Lee, K. C.** (2012) *Methylobacterium gossipiicola* sp. nov., a pink-pigmented, facultatively methylotrophic bacterium isolated from the cotton phyllosphere. *Int J Syst Evol Microbiol.* 62, 162-167.

**Magurran, A. E.** (1988) *Ecological diversity and its measurement.* Princeton University Press. Princeton, US.

**Mancinelli, R. L.** (1995) The regulation of methane oxidation in soil. *Annu Rev Microbiol.* 49, 581-605.

**Mangos, T. J., Haas, M. J.** (1997) A spectrophotometric assay for the enzymatic demethoxylation of pectins and the determination of pectinesterase activity. *Anal Biochem.* 244, 357-366.

**Mantelin, S., Fischer-Le, S. M., Zakhia, F., Béna, G., Bonneau, S., Jeder, H., de Lajudie, P., Cleyet-Marel, J.-C.** (2006) Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots: *Phyllobacterium bourgognense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiyense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov., *Phyllobacterium brassicacearum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 56, 827-839.

**Margulies, M., Egholm, M., Altman, W., Attiya, S., Bader, J. S., Bembien, L., Berka, J., Braverman, M. S., Chen, Y. -J., Chen, Z., Dewell, S. B., Du, L., Fierro, J. M., Gomes, X. V., Godwin, B. C., He, W., Helgesen, S., Ho, C. H., Irzyk, G. P., Jando, S. C., Alenquer, M. L. I., Jarvie, T., Jirage, K., Kim, J.-B., Knight, J. R., Lanza, J. R., Leamon, J. H., Lefkowitz, S. M., Lei, M., Li, J., Lohman, K. L., Lu, H., Makhijani, V. B., McDade, K. E., McKenna, M. P., Meyers, E. M., Nickerson, E., Nobile, J. R., Plant, R., Puc, B. P., Ronan, M. J., Roth, G. T., Sarkis, G. J., Simons, J. F., Simpson, J. W., Srinivasan, M., Tartaro, K. R., Tomasz, A., Vogt, K. A., Volkmer, G. A., Wang, S. H., Wang, Y., Weiner, M. P., Yu, P., Begley, R. F., Rothberg, J. M.** (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature.* 437, 376-380.

**Marshall, V.G.** (2000) Impacts of forest harvesting on biological processes in northern forest soils. *Forest Ecol Manag.* 133, 43-60.

**McAnulla, C., McDonald, I. R., Murrell, J. C.** (2001) Methyl chloride utilising bacteria are ubiquitous in the natural environment. *FEMS Microbiol Lett.* 201, 151-155.

**McDonald, I. R und Murrell, J. C.** (1997) The methanol dehydrogenase structural gene *mxoF* and its use as a functional gene probe for methanotrophs and methylotrophs. *Appl Environ Microbiol.* 63, 3218-3224.

**McDonald, I. R., Bodrossy, L., Chen, Y., Murrell, J. C.** (2008) Molecular ecology techniques for the study of aerobic methanotrophs. *Appl Environ Microbiol.* 74, 1305-1315.

**McFeeter, R. F., Armstrong, S. A.** (1984) Measurement of pectin methylation in plant cell walls. *Anal Biochem.* 139, 212-217.

**McKenzie, L. M., Hao, W. M., Richards, G. N., Ward, D. E.** (1995) Measurement and modeling of air toxins from smoldering combustion of biomass. *Environ Sci Technol.* 29, 2047-2054.

**McLeod, M. P., Warren, R. L., Hsiao, W. W., Araki, N., Myhre, M., Fernandes, C., Miyazawa, D., Wong, W., Lillquist, A. L., Wang, D., Dosanjh, M., Hara, H., Petrescu, A., Morin, R. D., Yang, G., Stott, J. M., Schein, J. E., Shin, H., Smailus, D., Siddiqui, A. S., Marra, M. A., Jones, S. J., Holt, R., Brinkman, F. S., Miyauchi, K., Fukuda, M., Davies, J. E., Mohn, W. W., Eltis, L. D.** (2006) The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 15582-15587.

**Meena, K. K., Kumar, M., Kalyuzhnaya, M. G., Yandigeri, M. S., Singh, D. P., Saxena, A. K., Arora, D. K.** (2012) Epiphytic pink-pigmented methylotrophic bacteria enhance germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum*) by producing phytohormone. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 101, 777-786.

**Menneer, J. C., Ledgard, S., McLay, C., Silvester, W.** (2005) Animal treading stimulates denitrification in soil under pasture. *Soil Biol Biochem.* 37, 1625–1629.

**Mergaert, J., Cnockaert, M. C., Swings, J.** (2002) *Phyllobacterium myrsinacearum* (subjective synonym *Phyllobacterium rubiacearum*) emend. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52, 1821-1823.

**Mevarech, M., Frolov, F., Gloss, L. M.** (2000) Halophilic enzymes: Proteins with a grain of salt. *Biophys Chem.* 86, 155-164.

**Milne, P.J., Riemer, D. D., Zika, R. G., Brand, L. E.** (1995) Measurement of vertical distribution of isoprene in surface seawater, its chemical fate, and its emission from several phytoplankton monocultures. *Mar Chem.* 48, 237-244.

**Mitchell, P.** (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature.* 191, 144-148.

**Mizuno, M., Yurimoto, H., Yoshida, N., Iguchi, H., Sakai, Y.** (2012) Distribution of pink-pigmented facultative methylotrophs on leaves of vegetables. *Biosci Biotechnol Biochem.* 76, 578-580.

**Mohanty, S. R., Bodelier, P. L. E., Floris, V., Conrad, R.** (2006) Differential effects of nitrogenous fertilizers in methane-consuming microbes in rice field and forest soils. *Appl Environ Microbiol.* 72, 1346-1354.

**Mohanty, S. R., Bodelier, P. L., Conrad, R.** (2007) Effect of temperature on composition of the methanotrophic community in rice field and forest soil. *FEMS Microbiol Ecol.* 62, 24-31.

**Moosvi, S. A., Pacheco, C. C., McDonald, I. R., De Marco, P., Pearce, D. A., Kelly, D. P., Wood, A. P.** (2005) Isolation and properties of methanesulfonate-degrading *Afipia felis* from Antarctica and comparison with other strains of *A. felis*. *Environ Microbiol.* 7, 22-33.

**Morris, M. S., Novak, J. T.** (1989) Mechanisms responsible for the biodegradation of organic compounds in the subsurface. *J Hazard Mater.* 22, 393-406.

**Mühlhardt, C.** (2009) Der Experimentator. Molekularbiologie/Genomics. 6. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg.

**Murase, J. und Frenzel, P.** (2007) A methane-driven microbial food web in a wetland rice soil. *Environ Microbiol.* 9, 3025-3034.

**Murashige, T. und Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15, 473-497.

**Murrell, J. C. und Dalton, H.** (1983) Nitrogen fixation in obligate methanotrophs. *J Gen Microbiol.* 129, 3481-3486.

**Murrell, J. C. und McDonald, I. R.** (2003) Methylophony. In: Schaechter M., Lederberg J. (Hrsg.) *The Desk Encyclopedia of Microbiology*. Elsevier Academic Press. San Diego, US.

**Nacke, H., Thürmer, A., Wollherr, A., Will, C., Hodac, L., Herold, N., Schöning, I., Schrumppf, M., Daniel, R.** (2011) Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in German forest and grassland soils. *PLoS ONE* 6: e17000. doi: 10.1371/journal.pone.0017000.

**Nadalig, T., Farhan UI Haque, M., Roselli, S., Schaller, H., Bringel, F., Vuilleumier, S.** (2011) Detection and isolation of chloromethane-degrading bacteria from the *Arabidopsis thaliana* phyllosphere, and characterization of chloromethane utilization genes. *FEMS Microbiol Ecol.* 77, 438-448.

**Naether, A., Foesel, B. U., Naegele, V., Wüst, P. K., Weinert, J., Bonkowski, M., Alt, F., Oelmann, Y., Polle, A., Lohaus, G., Gockel, S., Hemp, A., Kalko, E. K., Linsenmair, K. E., Pfeiffer, S., Renner, S., Schöning, I., Weisser, W. W., Wells, K., Fischer, M., Overmann, J., Friedrich, M. W.** (2012) Environmental factors affect Acidobacterial communities below the subgroup level in grassland and forest soils. *Appl Environ Microbiol.* 78, 7398-7406.

**Nakatsu, C. H., Hristova, K., Hanada, S., Meng, X. Y., Hanson, J. R., Scow, K. M., Kamagata, Y.** (2006) *Methylibium petroleiphilum* gen. nov., sp nov., a novel methyl tert-butyl ether-degrading methylotroph of the *Betaproteobacteria*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 56, 983-989.

**Nebel, M. E., Wild, S., Holzhauser, M., Hüttenberger, L., Reitzig, R., Sperber, M., Stoeck, T.** (2011) JAGUC-a software package for environmental diversity analyses. *J Bioinform Comput Biol.* 9, 749-773.

**Nemecek-Marshall, M., MacDonald, R. C., Franzen, J. J., Wojciechowski, C., Rall, R.** (1995) Methanol emission from leaves. Enzymatic detection of gas-phase methanol and relation of methanol fluxes to stomatal conductance and leaf development. *Plant Physiol.* 108, 1359-1368.

**Nercessian O., Kalyuzhnaya M. G., Joye S. B., Lidstrom, M. E., Chistoserdova L.** (2005) Analysis of *fae* and *fhcD* genes in Mono Lake, California. *Appl Environ Microbiol.* 71, 8949-8953.

**Neufeld, J. D., Chen, Y., Dumont, M. G., Murrell, J. C.** (2008) Marine methylotrophs revealed by stable-isotope probing, multiple displacement amplification and metagenomics. *Environ Microbiol.* 10, 1526-1535.

**Neufeld, J. D., Schäfer, H., Cox, M. J., Boden, R., McDonald, I. R., Murrell, J.C.** (2007) Stable-isotope probing implicates *Methylophaga* spp and novel *Gammaproteobacteria* in marine methanol and methylamine metabolism. *ISME J.* 1, 480-491.

**Noguchi, H., Park, J., Takagi, T.** (2006) MetaGene: Prokaryotic gene finding from environmental genome shotgun sequences. *Nucleic Acids Res.* 34, 5623–5630.

**Nojiri, M., Hira, D., Yamaguchi, K., Okajima, T., Tanizawa, K., Suzuki, S.** (2006) Crystal structures of cytochrom c(L) and methanol dehydrogenase from *Hyphomicrobium denitrificans*: Structural and mechanistic insights into interactions between two proteins. *Biochemistry.* 45, 3481-3492.

**Noll, M., Frenzel, P., Conrad, R.** (2008) Selective stimulation of type I methanotrophs in a rice paddy soil by urea fertilization revealed by RNA-based stable isotope probing. *FEMS Microbiol Ecol.* 65, 125-132.

**Noll, M., Matthies, D., Frenzel, P., Derakshani, M., Liesack, W.** (2005) Succession of bacterial community structure and diversity in a paddy soil oxygen gradient. *Environ Microbiol.* 7, 382-395.

**Nunn, D. N. und Lidstrom, M. E.** (1986) Isolation and complementation analysis of 10 methanol oxidation mutant classes and identification of the methanol dehydrogenase structural gene of *Methylobacterium* sp. strain AM1. *J Bacteriol.* 166, 581-590.

**Ogiso, T., Ueno, C., Dianou, D., Huy, T. V., Katayama, A., Kimura, M., Asakawa, S.** (2012) *Methylomonas koyamae* sp. nov., a type I methane-oxidizing bacterium from floodwater of a rice paddy field in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol.* 62, 1832-1837.

**Omer, Z. S., Tombolini, R., Gerhardson, B.** (2004) Plant colonization by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria (PPFMs). *FEMS Microbiol Ecol.* 47, 319-326.

**Op den Camp, H. J. M., Islam, T., Stott, M. B., Harhangi, H. R., Hynes, A., Schouten, S., Jetten, M. S. M., Birkeland, N. -K., Pol, A., Dunfield, P. F.** (2009) Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic *Verrucomicrobia*. *Environ Microbiol.* 1, 293-306.

**Padan, E., Bibi, E., Ito, M., Krulwich, T. A.** (2005) Alkaline pH homeostasis in bacteria: New insights. *Biochim Biophys Acta.* 1717, 67-88.

**Parameswaran, P., Jalili, R., Tao, L., Shokralla, S., Gharizadeh, B., Ronaghi, M., Fire, A. Z.** (2007) A pyrosequencing-tailored nucleotide barcode design unveils opportunities for large-scale sample multiplexing. *Nucleic Acids Res.* 35: e130. Online verfügbar. doi: 10.1093/nar/gkm760.

**Park, J. H., Kim, S. W., Kim, E., Ro, Y. T., Kim, Y. M.** (2001) Stress-shock response of a methylotrophic bacterium *Methylovorus* sp. strain SS1 DSM 11726. *J Microbiol.* 39, 162-167.

**Park, S. W., Hwang, E. H., Park, H., Kim, J. A., Heo, J. , Lee, K. H., Song, T., Kim, E., Ro, Y. T., Kim, S. W., Kim, Y. M.** (2003) Growth of *Mycobacteria* on carbon monoxide and methanol. *J Bacteriol.* 185, 142-147.

**Peel, D. und Quayle, J. R.** (1961) Microbial growth on C1 compounds. I. Isolation and characterization of *Pseudomonas* AM 1. *Biochem J.* 81, 465–469.

**Penger, J. S., Conrad, R. und Blaser, M. B.** (2012) Stable carbon isotope fractionation by methylotrophic methanogenic archaea. *Appl Environ Microbiol.* 78, 7596-7602.

**Peyraud, R., Kiefer, P., Christen, P., Massou, S., Portais, J. C., Vorholt, J. A.** (2009) Demonstration of the ethylmalonyl-CoA pathway by using  $^{13}\text{C}$  metabolomics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 4846-4851.

**Pol, A., Heijmans, K., Harhangi, H. R., Tedesco, D., Jetten, M. S. M., Op den Camp, H. J. M.** (2007) Methanotrophy below pH 1 by a new *Verucomicrobia* species. *Nature.* 450, 874-879.

**Pontes, H., Guedes de Pinho, P., Casal, S., Carmo, H., Santos, A., Magalhães, T., Remião, F., Carvalho, F., Lourdes Bastos, M.** (2009) GC determination of acetone, acetaldehyde, ethanol, and methanol in biological matrices and cell culture. *J Chromatogr Sci.* 47, 272-278.

**Pruesse, E., Peplies, J., Glöckner, R. O.** (2012) SINA: Accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics*, 28, 1823-1829.

**Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F. O.** (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. 41, D590-D596.

**Quince, C., Lanzén, A., Curtis, T. P., Davenport, R. J., Hall, N., Head, I. M., Read, L. F., Sloan, W. T.** (2009) Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nat Methods.* 6, 639-641.

**Quince, C., Lanzen, A., Davenport, R. J., Turnbaugh, P. J.** (2011) Removing noise from pyrosequenced amplicons. *BMC Bioinformatics.* 28, 12-38.

**Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N. R., Murrell, J. C.** (2000) Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature.* 403, 646-649.

**Radajewski, S., Webster, G., Reay, D. S., Morris, S. A., Ineson, P., Nedwell, D. B., Prosser, J. I., Murrell, J. C.** (2002) Identification of active methylotroph populations in an acidic forest soil by stable-isotope probing. *Microbiology.* 148, 2331-2342.

**Rahalkar, M., Bussmann, I., Schink, B.** (2007) *Methylomonas difficile* gen. nov., sp. nov., a novel methanotroph enriched by gradient cultivation from littoral sediment of Lake Constance. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57, 1073-1080.

- Ramana, V. V., Chakravarthy, S. K., Raj, P. S., Kumar, B. V., Shobha, E., Ramaprasad, E. V., Sasikala, Ch., Ramana, Ch. V.** (2012) Descriptions of *Rhodopseudomonas parapalustris* sp. nov., *Rhodopseudomonas harwoodiae* sp. nov. and *Rhodopseudomonas pseudopalustris* sp. nov., and emended description of *Rhodopseudomonas palustris*. Int J Syst Evol Microbiol. 62, 1790-1798.
- Ras, J., Van Ophem, P. W., Reijnders, W. N., Van Spanning, R. J., Duine, J. A., Stouthamer, A. H., Harms, N.** (1995) Isolation, sequencing, and mutagenesis of the gene encoding NAD- and glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase (GD-FALDH) from *Paracoccus denitrificans*, in which GD-FALDH is essential for methylotrophic growth. J Bacteriol. 177, 247-251.
- Récamier, K. S., Hernández-Gómez, A., Gonzáles-Damián, J., Ortega-Blake, I.** (2010). Effect of membrane structure on the action of polyenes: I. Nystatin action in cholesterol- and ergosterol-containing membranes. J Membrane Biol. 237, 31-40.
- Reshetnikov, A. S., Khmelenina, V. N., Mustakhimov, I. I., Trotsenko, Y. A.** (2011) Genes and enzymes of ectoine biosynthesis in halotolerant methanotrophs. Methods Enzymol. 495, 15-30.
- Richter, D. C., Ott, F., Auch, A. F., Schmid, R., Huson, D. H.** (2008) MetaSim: A sequencing simulator for genomics and metagenomics. PLoS One. 3: e3373. Online verfügbar. doi: 10.1371/journal.pone.0003373.
- Romanovskaya, V. A., Stolyar, S. M., Malashenko, Y. R., Dodatko, T. N.** (2001) The ways of plant colonization by *Methylobacterium* strains and properties of these bacteria. Microbiol. 70, 263-269.
- Rothberg, J. M. und Leamon, J. H.** (2008) The development and impact of 454 sequencing. Nat Biotechnol. 29, 1117-1124.
- Rowell D.L.** (1994) Bodenkunde: Untersuchungsmethoden und ihre Anwendungen. Springer. Berlin.
- Royston, J. P.** (1995) A remark on AS R94: A remark on algorithm AS 181: The W test for normality. Appl Statist. 44, 547–551.
- Rupp, M. und Görisch, H.** (1988) Purification, crystallisation and characterization of quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. Biol Chem Hoppe Seyler. 369, 431-439.



**Sagova-Mareckova, M., Omelka, M., Cermak, L., Kamenik, Z., Olsovska, J., Hackl, E., Kopecky, J., Hadacek, F.** (2011) Microbial communities show parallels at sites with distinct litter and soil characteristics. *Appl Environ Microbiol.* 77, 7560-7567.

**Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. *Science.* 239, 487-491.

**Saitou, N. und Nei, M.** (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4, 406-425.

**Sambrook J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.** (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual.* 2. Auflage. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, US.

**Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74, 5463-5467.

**Sapra, R., Bagramyan, K., Adams, M. W.** (2003) A simple energy-conserving system: Proton reduction coupled to proton translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 7545-7550.

**Särkinen, T., Staats, M., Richardson, J. E., Cowan, R. S., Bakker, F. T.** (2012) How to open the treasure chest? Optimising DNA extraction from herbarium specimens. *PLoS ONE.* 7, e43808. Online verfügbar. doi: 10.1371/journal.pone.0043808.

**Schachtschabel, P., Blume, H.P., Brümmer, G.W., Schwertmann, U.** (2002) *Scheffer/Schachtschabel-Lehrbuch der Bodenkunde.* 15. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH. Heidelberg.

**Schauer, S., Kämpfer, P., Wellner, S., Spröer, C., Kutschera, U.** (2011) *Methylobacterium marchantiae* sp. nov., a pink-pigmented, facultatively methylotrophic bacterium isolated from the thallus of a liverwort. *Int J Syst Evol Microbiol.* 61, 870-876.

**Schink, B.** (2005) Principles of anaerobic degradation of organic compounds. In: Jördening, H. -J., Winter, J. (Hrsg.) *Environmental Biotechnology: Concepts and Applications.* Wiley-VCH. Weinheim.

**Schinner, F. und Sonnleiter, R.** (1996) *Bodenökologie: Mikrobiologie und Bodenenzymatik.* Band II. Bodenbewirtschaftung, Düngung und Rekultivierung. Springer, Berlin.

**Schloss, P. D., Larget, B. R., Handelsman, J.** (2004) Integration of microbial ecology and statistics: A test to compare gene libraries. *Appl Environ Microbiol.* 70, 5485-5492.

**Schmidt, S., Christen, P., Kiefer, P., Vorholt, J. A.** (2010) Functional investigation of methanol dehydrogenase-like protein XoxF in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Microbiology*. 156, 2575-2586.

**Schrumpf, M., Schulze, E. D., Kaiser, K., Schumacher, J.** (2011) How accurately can soil organic carbon stocks and stock changes be quantified by soil inventories? *Biogeosciences*. 8, 1193-1212.

**Schütte, U. M., Abdo, Z., Bent, S. J., Shyu, C., Williams, C. J., Pierson, J. D., Forney, L. J.** (2008) Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Appl Microbiol Biotechnol*. 80, 365-380.

**Segel, I.** (1993) *Enzyme kinetics: Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*. John Wiley & Sons. Chichester, UK.

**Sessitsch, A., Coenye, T., Sturz, A. V., Vandamme, P., Barka, E. A., Salles, J. F., Van Elsas, J. D., Faure, D., Reiter, B., Glick, B. R., Wang-Pruski, G., Nowak, J.** (2005) *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. *Int J Syst Evol Microbiol*. 55, 1187-1192.

**Shishkina, V. N., Iurchenko, V. V., Romanovskaia, V. A., Malashenko, Iu. R., Trotsenko Iu. A.** (1976) Alternativity of methane assimilation pathways in obligate methylotrophs. *Mikrobiologiya*. 45, 417-419.

**Siljanen, H. M., Saari, A., Bodrossy, L., Martikainen, P. J.** (2012) Seasonal variation in the function and diversity of methanotrophs in the littoral wetland of a boreal eutrophic lake. *FEMS Microbiol Ecol*. 80, 548-555.

**Šimek, M., Brůček, P., Hynšt, J., Uhlířová, E., Petersen, S. O.** (2006) Effects of excretal returns and soil compaction on nitrous oxide emissions from a cattle overwintering area. *Agr. Ecosyst Environ*. 112, 186–191.

**Singh, B. K., Tate, K. R., Kolipaka, G., Hedley, C. B., MacDonald, C. A., Millard, P., Murrell, J. C.** (2007) Effect of afforestation and reforestation of pastures on the activity and population dynamics of methanotrophic bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 73, 5153-5161.

**Singh, B. K., Millard, P., Whiteley, A. S., Murrell, J. C.** (2004) Unravelling rhizosphere-microbial interactions: Opportunities and limitations. *Trends Microbiol*. 12, 386-393.

**Singh, H. B., Kanakidou, M., Crutzen, P. J., Jacob, D. J.** (1995) High concentrations and photochemical fate of oxygenated hydrocarbons in the global troposphere, *Nature*. 378, 50-54.

**Singh, H. B., O'Hara, D., Herlth, D., Sachse, W., Blake, D. R., Bradshaw, J. D., Kanakidou, M., Crutzen, P. J.** (1994) Acetone in the atmosphere: Distribution, sources, and sinks. *J Geophys Res.* 99, 1805-1818.

**Sipiczki, M.** (2012) *Candida borneonana* sp. nov., a methanol-assimilating anamorphic yeast isolated from decaying fruit. *Int J Syst Evol Microbiol.* 62, 2303-2306.

**Skovran, E., Palmer, A. D., Rountree, A. M., Good, N. M., Lidstrom, M. E.** (2011) XoxF is required for expression of methanol dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* AM1. *J Bacteriol.* 193, 6032-6038.

**Slonczewski, J. L., Fujisawa, M., Dopson, M., Krulwich, T. A.** (2009) Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in bacteria and archaea. *Adv Microb Physiol.* 55, 1-79.

**Smith, K. A., Dobbie, K. E., Ball, B. C., Bakken, L. R., Sitaula, B. K., Hansen, S.; Brumme, R., Borken, W., Christensen, S., Prieme, A., Fowler, D., Macdonald, J. A., Skiba, U., Klemmedtsson, L., Kasimir-Klemmedtsson, A., Degorska, A., Orlanski, P.** (2000) Oxidation of atmospheric methane in Northern European soils, comparison with other ecosystems, and uncertainties in the global terrestrial sink. *Glob Change Biol.* 6, 791-803.

**Smith, L., Molson J., Maloney, K.** (2002) Potential impacts on groundwater of pure-phase methanol releases. URL: <https://info.ngwa.org/GWOL/pdf/022676595.PDF>. Aufgerufen am 04.01.2013.

**Sogin, M. L., Morrison, H. G., Huber, J. A., Welch, D. B. M., Huse, S. M., Neal, P. R., Arrieta, J. M., Herndl, G. J.** (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 12115-12120.

**Sokolov, I. G., Malashenko, Y. R., Romanovskaya, V. A.** (1981) Electron transport chain in thermophilic methanotroph *Methylococcus thermophilus*. *Mikrobiologiya.* 50, 13-29.

**Song, J. und Cho, J. C.** (2007) *Methylibium aquaticum* sp. nov., a betaproteobacterium isolated from a eutrophic freshwater pond. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57, 2125-2128.

**Sorokin, D. Y., Trotsenko, Y. A., Doronina, N. V., Tourova, T. P., Galinski, E. A., Kolganova, T. V., Muyzer, G.** (2007) *Methylohalomonas lacus* gen. nov., sp. nov and *Methylohalomonas kenyense* gen. nov., sp. nov., methylotrophic gammaproteobacteria from hypersaline lakes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57, 2762-2769.

**Sowell, S. M., Abraham, P. E., Shah, M., Verberkmoes, N. C., Smith, D. P., Barofsky, D. F., Giovannoni, S. J.** (2011) Environmental proteomics of microbial plankton in a highly productive coastal upwelling system. *ISME J.* 5, 856-865.

**Stackebrandt, E. und Ebers, J.** (2006) Taxonomic parameters revisited: Tarnished gold standards. *Microbiol Today.* 33, 152–155.

**Stackebrandt, E. und Goebel, B. M.** (1994) Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol.* 44, 846-849.

**Staley, J. T. und Konopka, A.** (1985) Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol.* 39, 321–346.

**Steenbergh, A. K., Meima, M. M., Kamst, M., Bodelier, P. L.** (2010) Biphasic kinetics of a methanotrophic community is a combination of growth and increased activity per cell. *FEMS Microbiol Ecol.* 71, 12-22.

**Stralis-Pavese, N., Sessitsch, A., Weilharter, A., Reichenauer, T., Riesing, J., Csontos, J., Murrell, J. C., Bodrossy, L.** (2004) Optimization of diagnostic microarray for application in analysing landfill methanotroph communities under different plant covers. *Environ Microbiol.* 6, 347-363.

**Sy A., Timmers, A. C., Knief, C., Vorholt, J. A.** (2005) Methylophilic metabolism is advantageous for *Methylobacterium extorquens* during colonization of *Medicago truncatula* under competitive conditions. *Appl Environ Microbiol.* 71, 7245-7252.

**Tamura, K.; Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. , Kumar, S.** (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 28, 2731-2739.

**Tanaka, N., Kusakabe, Y., Ito, K., Yoshimoto, T., Nakamura, K. T.** (2003) Crystal structure of glutathione-independent formaldehyde dehydrogenase. *Chem Biol Interact.* 143–144, 211–218.

**Táncsics, A., Szoboszlay, S., Kriszt, B., Kulolya, J., Baka, E., Márialigeti, K., Révész, S.** (2008) Applicability of the functional gene catechol 1,2-dioxygenase as a biomarker in the detection of BTEX-degrading *Rhodococcus* species. *J Appl Microbiol.* 105, 1026-1033.

**Tani, A., Sahin, N., Kimbara, K.** (2012 a) *Methylobacterium gnaphalii* sp. nov., isolated from leaves of *Gnaphalium spicatum*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 62, 2602-2607.

**Tani, A., Sahin, N., Kimbara, K.** (2012 b) *Methylobacterium oxalidis* sp. nov., isolated from leaves of *Oxalis corniculata*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 62, 1647-52.

**Tate R. L.** (1995) Soil Microbiology. John Wiley & Sons, Inc. New York, US.

**Ter Braak, C. J. F. und Šmilauer, P.** (2002) CANOCO reference manual and CanoDraw for Windows user`s guide: Software for canonical community ordination (version 4.5). Microcomputer Power. Ithaca, US.

**Thamm, C.** (2008) Evaluierung von funktionellen Genmarkern zur Erfassung Methanol-verwertender Lebensgemeinschaften in belüfteten Böden: *mxoF*, *mxoF'*, *mdh*. Lehrstuhl für ökologische Mikrobiologie, Universität Bayreuth. Bachelorarbeit.

**Tie, X., Guenther, A., Holland, E.** (2003) Biogenic methanol and its impacts on tropospheric oxidants. Geophys Res Lett. 30, 1881.

**Trempe, H.** (2005) Aufnahme und Analyse vegetationsökologischer Daten. Eugen Ulmer Verlag. Stuttgart.

**Trotsenko, Y. A. und Murrell, J. C.** (2008) Metabolic aspects of aerobic obligate methanotrophy. Adv Appl Microbiol. 63, 183-229.

**Trotsenko, Y. A., Ivanova, E. G., Doronina, N. V.** (2001) Aerobic methylotrophic bacteria as phytosymbionts. Microbiology. 70, 623-632.

**Tsien, H. C., Bratina, B. J., Tsuji, K., Hanson, R. S.** (1990) Use of oligodeoxynucleotide signature probes for identification of physiological groups of methylotrophic bacteria. Appl Environ Microbiol. 56, 2858-2865.

**Uetanabaro, A. P., Wahrenburg, C., Hunger, W., Pukall, R., Spröer, C., Stackebrandt, E., de Canhos, V. P., Claus, D., Fritze, D.** (2003) *Paenibacillus agarexodens* sp. nov., nom. rev., and *Paenibacillus agaridevorans* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 53, 1051-1057.

**Urakami, T., Tamaoka, J., Suzuki, K. I., Komagata, K.** (1989) *Paracoccus alcaliphilus* sp. nov., an alkaliphilic and facultatively methylotrophic bacterium. Int J Syst Bacteriol. 39, 116-121.

**Urmann, K., Lazzaro, A., Gandolfi, I., Schroth, M. H., Zeyer, J.** (2009) Response of methanotrophic activity and community structure to temperature changes in a diffusive CH<sub>4</sub>/O<sub>2</sub> counter gradient in an unsaturated porous medium. FEMS Microbiol Ecol. 69, 202-212.

**Valverde, A., Velázquez, E., Fernández-Santos, F., Vizcaíno, N., Rivas, R., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., Mariano, I. J., Willems, A.** (2005) *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. Int J Syst Evol Microbiol. 55, 1985-1989.

**Van der Heijden, M. G., Bardgett, R. D., van Straalen, N. M.** (2008) The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Lett.* 11, 296-310.

**Van Niel, C. B.** (1954) The chemoautotrophic and photosynthetic bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 8, 105–132.

**Vartoukian, S. R., Palmer, R. M., Wade, W. G.** (2010) Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 309, 1-7.

**Vasileva, L. V., Lafitskaya, T. N., Namsaraev, B. B.** (1979) *Angulomicrobium tetraedrale*, a new genus of budding bacteria with radial cell symmetry. *Mikrobiologiya.* 48, 1033-1039.

**Vaucher, J. P.** (1803) Histoire des conferves d'eau douce, contenant leurs différents modes de reproduction, et la description de leurs principales espèces. J. J. Paschoud. Genève, 1-285.

**Velghe, N., Claeys, A.** (1985) Rapid spectrophotometric determination of nitrate in mineral waters with resorcinol. *Analyst.* 110,313-314.

**Verhille, S., Baida, N., Dabboussi, F., Izard, D., Leclerc, H.** (1999) Taxonomic study of bacteria isolated from natural mineral waters: Proposal of *Pseudomonas jessenii* sp. nov. and *Pseudomonas mandelii* sp. nov. *Syst Appl Microbiol.* 22, 45-58.

**Viallard, V., Poirier, I., Cournoyer, B., Haurat, J., Wiebkin, S., Ophel-Keller, K., Balandreau, J.** (1998) *Burkholderia graminis* sp. nov., a rhizospheric *Burkholderia* species, and reassessment of [*Pseudomonas*] *phenazinum*, [*Pseudomonas*] *pyrrocinia* and [*Pseudomonas*] *glathei* as *Burkholderia*. *Int J Syst Bacteriol.* 48, 549-563.

**Volfová, O.** (1975) Studies on Methanol-oxidizing Yeasts III. Enzyme. *Folia Microbiol.* 20, 307-319.

**Vonck, J., Arfman, N., De Vries, G. E., Van Beeumen, J., Van Bruggen, E. F. J., Dijkhuizen, L.** (1991) Electron microscopic analysis and biochemical characterization of a novel methanol dehydrogenase from the thermotolerant *Bacillus* sp.C1. *J Biol Chem.* 266, 3949-3953.

**Vorholt J. A.** (2002) Cofactor-dependent pathways of formaldehyde oxidation in methylotrophic bacteria. *Arch Microbiol.* 178, 239-249.

**Vorholt, J. A.** (2012) Microbial life in the phyllosphere. *Nature rev Microbiol.* 10, 828- 840.

- Vorholt, J. A., Chistoserdova, L., Stolyar, S. M., Thauer, R. K., Lidstrom, M. E.** (1999) Distribution of tetrahydromethanopterin-dependent enzymes in methylotrophic bacteria and phylogeny of methenyl tetrahydromethanopterin cyclohydrolases. *J Bacteriol.* 181, 5750-5757.
- Vorholt, J. A., Marx, C. J., Lidstrom, M. E., Thauer, R. K.** (2000) Novel formaldehyde-activating enzyme in *Methylobacterium extorquens* AM1 required for growth on methanol. *J Bacteriol.* 182, 6645-6650.
- Vorobev, A. V., Baani, M., Doronina, N. V., Brady, A. L., Liesack, W., Dunfield, P. F., Dedysh, S. N.** (2011) *Methyloferula stellata* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, obligately methanotrophic bacterium that possesses only a soluble methane monooxygenase. *Int J Syst Evol Microbiol.* 61, 2456-2463.
- Vuilleumier, S., Chistoserdova, L., Lee, M. C., Bringel, F., Lajus, A., Zhou, Y., Gourion, B., Barbe, V., Chang, J., Cruveiller, S., Dossat, C., Gillett, W., Gruffaz, C., Haugen, E., Hourcade, E., Levy, R., Mangenot, S., Muller, E., Nadalig, T., Pagni, M., Penny, C., Peyraud, R., Robinson, D. G., Roche, D., Rouy, Z., Saenampechek, C., Salvignol, G., Vallenet, D., Wu, Z., Marx, C. J., Vorholt, J. A., Olson, M. V., Kaul, R., Weissenbach, J., Médigue, C., Lidstrom, M. E.** (2009) *Methylobacterium* genome sequences: A reference blueprint to investigate microbial metabolism of C1 compounds from natural and industrial sources. *PLoS One.* 4(5): e5584. Online verfügbar. doi: 10.1371/journal.pone.0005584.
- Wang, P., Wang, F., Xu, M., Xiao, X.** (2004) Molecular phylogeny of methylotrophs in a deep-sea sediment from a tropical west Pacific Warm Pool. *FEMS Microbiol Ecol.* 47, 77-84.
- Warneke, C., T. Karl, H. Judmaier, A. Hansel, A. Jordan, Lindinger, W.** (1999) Acetone, methanol, and other partially oxidized volatile organic emissions from dead plant matter by abiological processes: Significance for atmospheric HO<sub>x</sub> chemistry. *Global Biogeochem Cycles.* 13, 9-17.
- Watanabe, K., Hino S., Onodera, K., Kajie, S. -I., Takahashi, N.** (1996) Diversity in kinetics of bacterial phenol-oxygenating activity. *J Ferment Bioeng.* 81, 560-563.
- Wellner, S., Lodders, N., Kämpfer, P.** (2011) Diversity and biogeography of selected phyllosphere bacteria with special emphasis on *Methylobacterium* spp. *Syst Appl Microbiol.* 34, 621-630.

**Wellner, S., Lodders, N., Kämpfer, P.** (2012) *Methylobacterium cerastii* sp. nov., isolated from the leaf surface of *Cerastium holosteoides*. Int J Syst Evol Microbiol. 62, 917-924.

**Wennberg, P. O., Hanisco, T. F., Jaegle, L., Jacob, D. J., Hints, E. J., Lanzendorf, E. J., Anderson, J. G., Gao R. -S., Keim, E. R., Donnelly, S. G., Del Negro, L. A., Fahey, D. W., McKeen, S. A., Salawitch, R. J., Webster C. R., May, R. D., Herman, R. L., Proffitt, M. H., Margitan, J. J., Atlas, E. L., Schauffler, S. M., Flocke, F., McElroy, C. T., Bui, T. P.** (1998) Hydrogen radicals, nitrogen radicals, and the production of O<sub>3</sub> in the upper troposphere. Science. 279, 49-53.

**White, K. D., Novak, C. D., Goldsmith, C. D., Bevan, S.** (1986) Microbial degradation kinetics of alcohols in subsurface systems. In: Petroleum Hydrocarbons and Organic Chemicals in Ground Water - Prevention, Detection, and Restoration. Proc. NWWA/API Conference.

**White, S., Boyd, G., Mathews, F. S., Xia, Z. X., Dai, W. W., Zhang, Y. F., Davidson, V. L.** (1993) The active site structure of the calcium-containing quinoprotein methanol dehydrogenase. Biochemistry. 32, 12955-12958.

**Whittenbury, R., Philips, K. C., Wilkinson, J. F.** (1970) Enrichment isolation, and some properties of methane-utilizing bacteria. J Gen Microbiol. 61, 205-218.

**Will, C., Thürmer, A., Wollherr, A., Nacke, H., Herold, N., Schruppf, M., Gutknecht, J., Wubet, T., Biscot, F., Daniel, R.** (2010) Horizon-specific bacterial community composition of German grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. Appl Environ Microbiol. 76, 6751–6759.

**Willems, A., De Ley, J., Gillis, M., Kersters, K.** (1991) Comamonadaceae, a new family encompassing the Acidovorans rRNA complex, including *Variovorax paradoxus* gen. nov., comb. nov., for *Alcaligenes paradoxus* (Davis 169). Int J Syst Bacteriol. 41, 445-450.

**Williams, J. F.** (1989) Optimization strategies for the polymerase chain reaction. Biotechniques. 7, 762-769.

**Wink, M. und Mohamed, G. I. A.** (2003) Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: Mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of *rbcL* gene. Biochem System Ecol. 31, 897-917.

**Xie, C. H. und Yokota, A.** (2004) Transfer of *Hyphomicrobium indicum* to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium indicum* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 54, 2113-2116.



**Xin, Y. H., Zhou, Y. G., Chen, W. X.** (2006) *Ancylobacter polymorphus* sp. nov. and *Ancylobacter vacuolatus* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 56, 1185-1188.

**Xin, Y. H., Zhou, Y. G., Zhou, H. L., Chen, W. X.** (2004) *Ancylobacter rudongensis* sp. nov., isolated from roots of *Spartina anglica*. Int J Syst Evol Microbiol. 54, 385-388.

**Yamashita, S., Uchimura, T., Komagata, K.** (2004) Emendation of the genus *Acidomonas* Urakami, Tamaoka, Suzuki and Komagata 1989. Int J Syst Evol Microbiol. 54, 865-870.

**Young, J. M.** (2003) The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen *et al.* 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang *et al.* 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination '*Sinorhizobium adhaerens*' (Casida 1982) Willems *et al.* 2003 legitimate? Request for an Opinion. Int J Syst Evol Microbiol. 53, 2107-2110.

**Zaatreh, S.** (2008) Einfluss von Nitrat auf die Aktivität und Struktur von denitrifizierenden Populationen in Wald- und Grünlandböden. Lehrstuhl für ökologische Mikrobiologie, Universität Bayreuth. Bachelorarbeit.

**Zhao, G. Z., Li, J., Qin, S., Huang, H. Y., Zhu, W. Y., Xu, L. H., Li, W. J.** (2010) *Streptomyces artemisiae* sp. nov., isolated from surface-sterilized tissue of *Artemisia annua* L. Int J Syst Evol Microbiol. 60, 27-32.

**Zheng, Y., Yang, W., Sun, X., Wang, S. P., Rui, Y. C., Luo, C. Y., Guo, L. D.** (2012) Methanotrophic community structure and activity under warming and grazing of alpine meadow on the Tibetan Plateau. Appl Microbiol Biotechnol. 93, 2193-2203.

**Zhou, J., Wu, L., Deng, Y., Zhi, X., Jiang, Y. H., Tu, Q., Xie, J., Van Nostrand, J. D., He, Z., Yang, Y.** (2011) Reproducibility and quantitation of amplicon sequencing-based detection. ISME J. 5, 1303-1313.

## ANHANG

**Tab. A:** Ergebnisse der BLAST-Analyse zur taxonomischen Einordnung der Isolate zusammen mit den jeweiligen Kultivierungsbedingungen.

Isolat	Nächstverwandter Stamm	Sequenz-identität (%)	Bp	Plot	Ansatz <sup>a</sup>
1	<i>Rhodococcus erythropolis</i> DLC-slimb	100	799	HEW 5	I
2	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> R2-494	99	809	HEG 9	I
3	<i>Ensifer adhaerens</i> Sulf-1426	100	800	HEG 9	I
4	<i>Rhodococcus globerulus</i> AK36	100	790	HEW 12	I
5	<i>Pseudomonas thivervalensis</i> R2-494	99	799	HEG 9	I
6	<i>Ensifer adhaerens</i> Sulf-1426	100	780	HEG 9	I
7	<i>Methylobacterium aminovorans</i> JCM 8240	98	558	HEW 12	I
8	<i>Variovorax paradoxus</i> syhd796721xq	99	799	HEG 6	I
9	<i>Arthrobacter ramosus</i> IMER-B4-15	100	799	HEG 6	I
10	<i>Rhodococcus globerulus</i> AK36	100	729	HEW 12	I
11	<i>Pseudomonas brenneri</i> ES-138S	99	778	HEW 12	I
12	<i>Pseudomonas jessenii</i> PNP-F2	100	799	HEW 5	I
13	<i>Chitinophaga ginsengisegetis</i> Gsoil040	98	761	HEG 6	I
14	<i>Methylobacterium fujisawaense</i> DSM5686	99	718	HEW 12	I
15	<i>Sphingoterrabacterium koreensis</i> Gsoil3017	95	796	HEW 12	I
16	<i>Ensifer adhaerens</i> Sulf-1426	100	889	HEG 9	I
17	<i>Pseudomonas fluorescens</i> KL3C1	99	780	HEG 9	I
18	<i>Rhodococcus erythropolis</i> DLC-slimb	99	481	HEW 5	I
19	<i>Burkholderia fungorum</i> T12	100	809	HEW 12	I
20	<i>Flavobacterium saccharophilum</i> NBRC15944	99	869	HEG 6	I
21	<i>Pedobacter suwonensis</i> 15-52	98	770	HEG 9	I
22	<i>Variovorax paradoxus</i> S110	99	770	HEG 9	I
23	<i>Phyllobacterium trifolii</i> ZW3-1	99	879	HEG 9	A
24	<i>Phyllobacterium trifolii</i> ZW3-1	100	849	HEG 9	A
25	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> LN8	97	819	HEW 12	A
26	<i>Flavobacterium johnsoniae</i> DSM425	99	889	HEG 6	A
27	<i>Caulobacter henricii</i> ATCC15253	99	869	HEW 5	B
28	<i>Flavobacterium hydatis</i> DSM2063	99	849	HEW 5	B
29	<i>Aurantimonas altamirensis</i> IFP14.1	97	889	HEG 9	D
30	<i>Flavobacterium columnare</i>	99	778	HEG 6	B
31	<i>Flavobacterium aquidurensense</i> WB1.1-56	100	829	HEG 9	D
32	<i>Flavobacterium saccharophilum</i> NBRC15944	99	829	HEW 5	A
33	<i>Flavobacterium aquidurensense</i> WB1.1-56	99	879	HEG 6	A
34	<i>Flavobacterium johnsoniae</i> DSM425	100	788	HEG 6	A
35	<i>Arthrobacter methylotrophus</i> TGA	98	770	HEG 6	D
36	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> DX1	86	891	HEW 5	B
37	<i>Flavobacterium aquidurensense</i> WB1.1-56	98	1348	HEW 5	B
38	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> DX-1	87	906	HEW 5	B
39	<i>Flavobacterium aquidurensense</i> WB1.1-56	98	1358	HEW 5	B
40	<i>Variovorax paradoxus</i> S110	98	772	HEW 12	C
41	<i>Variovorax paradoxus</i> S110	98	665	HEW 12	C
42	<i>Mucilaginibacter kameinonensis</i> SCK	92	601	HEW 5	D
43	<i>Burkholderia glathei</i> Hg18	98	774	SEW 5	A
44	<i>Rhodococcus erythropolis</i> F2	99	722	SEW 5	A
45	<i>Herbaspirillum frisingense</i> 75B	97	691	SEW 5	A
46	<i>Lapillicoccus jejuensis</i> R-Ac013T	98	1380	SEW 5	C
47	<i>Methylocella tundrae</i> T4	98	773	SEW 5	B
48	<i>Methylobacterium organophilum</i> NS8	93	1328	SEW 5	B
49	<i>Methylobacterium jeotgali</i> S2R03-9	97	902	SEW 5	B
50	<i>Burkholderia glathei</i> Hg19	100	777	SEW 5	C
51	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> CCBAU61210	99	1330	HEG 9	A

## Fortsetzung Tab. A.

Isolat	Nächstverwandter Stamm	Sequenz-identität (%)	Bp	Plot	Ansatz <sup>a</sup>
52	<i>Luteibacter rhizovicius</i> LJ96T	99	1300	HEW 5	A
53	<i>Microbacterium pumilum</i> KV-488	99	1345	HEG 9	B
54	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> C23-2420	99	894	HEW 12	B
55	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> KT5501	99	773	HEG 9	B
56	<i>Flavobacterium aquidurensense</i> WB1.1-56	99	919	HEW 5	B
57	<i>Caulobacter henricii</i> ATCC15253	99	906	HEW 12	B
58	<i>Hyphomicrobium vulgare</i> ATCC27500	95	914	HEW 12	B
59	<i>Bacillus simplex</i> DSM1321T	99	922	HEW 12	C
60	<i>Bacillus simplex</i> DSM1321T	99	927	HEW 12	C
61	<i>Aurantimonas altamirensis</i> NML070722	98	1313	HEG 9	D
62	<i>Afipia felis</i> IZ17	99	761	HEW 12	A
63	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> SEMIA690	91	1363	HEW 12	A
64	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> SEMIA690	98	1310	HEW 12	A
65	<i>Phyllobacterium brassicacearum</i> STM196	99	1324	AEW 8	A
66	<i>Flavobacterium frigidimarum</i> KUC-1	98	1375	SEW 5	A
67	<i>Flavobacterium frigidimarum</i> KUC-1	98	1363	HEG 6	A
68	<i>Phyllobacterium brassicacearum</i> STM196	99	1345	HEG 9	A
69	<i>Flavobacterium aquidurensense</i> WB1.1-56	98	767	HEW 12	B
70	<i>Flavobacterium aquidurensense</i> WB1.1-56	96	768	SEW 5	B
71	<i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4	99	1341	SEW 5	C
72	<i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4	99	1381	SEW 5	C
73	<i>Aurantimonas altamirensis</i> S21B	98	1269	HEG 9	B
74	<i>Aurantimonas altamirensis</i> S21B	98	1316	HEG 9	B
75	<i>Burkholderia glathei</i> BLN8	98	910	SEW 5	C
76	<i>Aminobacter aminovorans</i> A27	98	826	SEW 5	C
77	<i>Aminobacter aminovorans</i> A27	99	641	SEW 5	C
78	<i>Hyphomicrobium facile</i> subsp. <i>tolerans</i> IFAMI-551	99	819	SEW 5	C
79	<i>Paenibacillus wynnii</i> 95XG9	96	811	SEW 5	C
80	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> SEMIA6208	99	908	SEW 5	C
81	<i>Hyphomicrobium facile</i> NBCS7	97	908	SEW 5	C
82	<i>Aminobacter aminovorans</i> c88	97	899	SEW 5	B
83	<i>Aminobacter niigataensis</i> DSM7050	98	1282	SEW 5	B
84	<i>Aminobacter aminovorans</i> c88	99	1343	SEW 5	B
85	<i>Burkholderia sordidicola</i> BLN14	99	927	SEW 5	B
86	<i>Collimonas fungivorans</i> CTE227	99	926	SEW 5	B
87	<i>Burkholderia sediminicola</i> HU2-65W	99	728	SEW 5	B
88	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> RLA12	98	1350	SEW 9	A
89	<i>Paenibacillus pectinilyticus</i> RCB-08	96	1392	SEW 9	A
90	<i>Inquilinus limosus</i> AU1979	99	772	AEW 8	A
91	<i>Bradyrhizobium canariense</i> BLUT8	99	727	SEW 9	A
92	<i>Pseudomonas migulae</i>	99	918	AEW 8	A
93	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> JNFb5	99	903	AEW 8	A
94	<i>Williamsia muralis</i> MA140-96T	98	906	AEG 9	A
95	<i>Afipia massiliensis</i> 34633	97	1263	AEW 8	A
96	<i>Mycobacterium moriokaense</i> CIP105393	99	907	AEW 8	B
97	<i>Burkholderia phenazinium</i> LNW3	97	946	AEW 8	B
98	<i>Burkholderia phenazinium</i> Hg14	98	1409	AEW 8	E
99	<i>Afipia felis</i> ATCC 49715	97	1360	HEW 12	A
100	<i>Mycobacterium vaccae</i> VM0588	98	1368	HEG 6	A
101	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> JNFb5	98	1354	HEG 6	A
102	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	97	1370	HEG 6	B
103	<i>Flavobacterium aquidurensense</i> WB1.1-56	98	1362	HEW 12	B
104	<i>Nocardioideus fulvus</i> SAFR-005	99	1363	HEW 5	C
105	<i>Paenibacillus castaneae</i> Ch-32	98	776	HEW 5	D
106	<i>Mycobacterium hodleri</i> DSM44183	98	1364	HEG 6	E

## Fortsetzung Tab. A.

Isolat	Nächstverwandter Stamm	Sequenz-identität (%)	Bp	Plot	Ansatz <sup>a</sup>
107	<i>Mycobacterium hodleri</i> DSM44183	97	781	HEG 6	E
108	<i>Mycobacterium hodleri</i> DSM44183	97	781	HEG 6	E
109	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA121	98	1353	HEW 5	A
110	<i>Bacillus drementensis</i> WN575	100	756	HEW 5	A
111	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA121	99	1354	HEG 6	C
112	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA121	99	1336	HEG 6	C
113	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA121	99	1346	HEG 9	C
114	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA121	99	1356	HEG 6	C
115	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA121	98	1344	HEW 5	D
116	<i>Methylobacterium adhaesivum</i> AR27T	97	1331	HEG 9	A
117	<i>Streptomyces</i> sp. AKB-2008-TE41	100	666	HEG 9	A
118	<i>Bradyrhizobium canariense</i> SEMIA928	99	655	AEW 6	B
119	<i>Bradyrhizobium canariense</i> SEMIA928	99	549	AEW 8	B
120	<i>Mesorhizobium amorphae</i> rob8	100	715	AEW 8	B
121	<i>Pseudomonas migulae</i> PD17	99	623	AEW 8	B
122	<i>Paenibacillus chondroitinus</i> OS-213.a	98	633	AEW 8	A
123	<i>Burkholderia glathei</i> Hg11	98	617	SEW 9	A
124	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> CCBAU61214	100	725	AEW 6	A
125	<i>Mycobacterium diernhoferi</i> ATCC19340	98	725	AEW 6	A
126	<i>Bradyrhizobium canariense</i> RS-3	99	725	AEW 8	A
127	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> ISLU213	99	725	AEW 8	A
128	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> LNW9	99	725	AEW 8	A
129	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> ISLU213	100	725	AEW 8	A

<sup>a</sup>Tab. 19

**Tab. B:** Absolute Mengen an Radioaktivität (dpm), die in den Reaktionsgefäßen der CO<sub>2</sub>-Falle (Abb. 4) im Rahmen des Versuches "Methanoxidation in Bodenaufschlämmungen und durch Pflanzenmaterial" (2.6.2; Abb. 7) aufgefangen wurden. Die Ansätze wurden zum Teil in Form von Duplikaten hergestellt.

Ansatz	Aufschlämmung	Radioaktivität (dpm) <sup>a</sup> in Form von CO <sub>2</sub> nach 0 Tagen	Radioaktivität (dpm) <sup>a</sup> in Form von CO <sub>2</sub> nach 13 Tagen
Steriles Wasser	1	90	79
Steriles Wasser mit Cyanid	1	99	183
Boden HEG 6	1	103	2976
Boden HEG 6	2	75	2596
Boden HEG 6 mit Cyanid	1	71	71
Boden HEG 6 mit Cyanid	2	75	77
Boden OG	1	278	2033
Boden OG	2	255	1841
Boden OG mit Cyanid	1	72	117
Boden OG mit Cyanid	2	77	185
Boden FG	1	270	4793
Boden FG	2	266	3829
Boden FG mit Cyanid	1	101	3672
Boden FG mit Cyanid	2	82	3676
Gewaschene Wurzeln	1	98	393
Gewaschene Wurzeln	2	131	296
Gewaschene Wurzeln mit Cyanid	1	65	120
Gewaschene Wurzeln mit Cyanid	2	73	329
<i>A. thaliana</i>	1	92	536
<i>A. thaliana</i>	2	95	328
<i>A. thaliana</i> mit Cyanid	1	76	51
<i>A. thaliana</i> mit Cyanid	2	65	52
Pilz	1	49	147
Pilz	2	52	120

<sup>a</sup>dpm, Desintegrationen pro Minute.

**Tab. C:** Absolute Mengen an Radioaktivität (dpm), die in den Reaktionsgefäßen der CO<sub>2</sub>-Falle (Abb. 4) im Rahmen des Versuches "Wiederfindung des radioaktiv-markierten Kohlenstoffs" (2.6.5; Abb. 10) aufgefangen wurden. Die Ansätze wurden in Form von Duplikaten hergestellt.

Boden	Aufschlammung	[CH <sub>3</sub> OH] in µmol g <sub>TG</sub> <sup>-1</sup>	Radioaktivität (dpm) <sup>a</sup> in Form von CO <sub>2</sub>	Radioaktivität (dpm) <sup>a</sup> in Form von Carbonat	Radioaktivität (dpm) <sup>a</sup> in der wässrigen Phase	Radioaktivität (dpm) <sup>a</sup> im Boden
FG	1	0,004	13360	29140	9840	6700
	2	0,004	15746	27250	7670	6760
	1	0,140	27612	5010	2360	7980
	2	0,140	30664	3330	1590	6660
	1	1,369	47812	2400	1500	6540
	2	1,369	58491	2570	1560	7360
	1	13,661	60544,8	5790	2020	5820
	2	13,661	69728,6	2720	1720	5160
	1	136,612	68999	3520	1690	5580
	2	136,612	62269	3000	1550	7040
	1	683,060	64907	2890	1590	7140
	2	683,060	76147	3090	1760	1020
HEG 6	1	0,002	17776	62730	8630	9720
	2	0,002	164878	73450	7500	8252
	1	0,062	42184	9870	1870	14220
	2	0,062	47110	8980	21800	11740
	1	0,606	52692	6130	2390	7160
	2	0,606	65193	2550	1440	13920
	1	6,056	65281	12780	2320	10300
	2	6,056	74825	7910	2520	11000
	1	60,435	73228	8110	2740	8740
	2	60,435	67793	8430	2700	11000
	1	302,176	68493	8380	2700	9180
	2	302,176	81481	9020	2590	9120

<sup>a</sup>dpm, Desintegrationen pro Minute.

## DANKSAGUNG

Besonders möchte ich mich bei **PD Dr. Steffen Kolb** für die Überlassung dieses Themas und die hervorragende Betreuung bedanken. Er hatte stets ein offenes Ohr für alle Probleme und unsere fachlichen Gespräche waren für mich besonders wertvoll.

---

Bei **Prof. Harold L. Drake** möchte ich mich für seine stetige Unterstützung und für seine Ratschläge während und nach den Laborseminaren bedanken. Die Jahre an seinem Lehrstuhl waren sehr lehrreich und werden mir immer in guter Erinnerung bleiben.

---

Ich bedanke mich bei **Prof. Dr. Matthias Noll** (Hochschule Coburg) für einen ausgezeichneten Crashkurs in Statistik und für die zahlreichen informativen Telefongespräche.

---

Ich möchte mich bei **Prof. Dr. Angelika Mustroph** für die detaillierte Anleitung zur Züchtung von *Arabidopsis thaliana* bedanken.

---

Mein Dank geht an **Dr. Charles K. Lee** (Universität Waikato) für seine Unterstützung bei der Auswertung der Pyrosequenzierungsdaten.

---

Ich bedanke mich bei **allen meinen Kollegen am Lehrstuhl für Ökologische Mikrobiologie**. Ganz besonders danke ich **Mirjam Selzer**, meiner PROLINKS-Kollegin, für die wissenschaftlichen Diskussionen und viel mehr für die moralische Unterstützung. Ein besonderes Dankschön geht an **Anita Gößner**, **Daria Schulz** und **Ralf Mertel**, die mit Rat und Tat zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen. Mein Dank geht an **Dr. Katharina Palmer**, die sich mit mir durch zahlreiche Computerprogramme gekämpft hat. **Adam Wieczorek** danke ich für die guten Gespräche und seine Freundschaft. **Peter Depkat-Jacob** danke ich für die vielen Ratschläge und Aufmunterungsversuche. **Anja Ramm** danke ich für die gute Zusammenarbeit im Isotopenlabor. Meinen Bachis, **Linda Ebertsch**, **Steffi Hetz** und **Niclas Lampert**, danke ich für ihren unermüdlichen Einsatz im Moli-Lab.

---

Ich danke meinen Eltern, **Marianne Schäfer** und **Josef Stacheter**, und dem besten Bruder der Welt, **Robert Stacheter**, dafür, dass ich mich immer auf sie verlassen kann. Unvergessen ist die Unterstützung, die ich durch **Dieter Schäfer** erfahren habe. **Enrico Dötsch** danke ich dafür, dass er immer hinter mir steht und mir ein Zuhause gegeben hat.

## PUBLIKATIONEN

### Artikel in einer Zeitschrift mit „Peer Review“-System

**Stacheter, A.**, Noll, M., Lee, C. K., Selzer, M., Glowik, B., Ebertsch, L., Mertel, R., Schulz, D., Lampert, N., Drake, H. L., Kolb, S. (2012) Methanol oxidation by temperate soils and environmental determinants of associated methylotrophs. *ISME J.* Online verfügbar. doi: 10.1038/ismej.2012.167.

### Vortrag

**Stacheter, A.**, Drake, H. L., Kolb, S. (2012) Methanol consumption by methylotrophs in temperate aerated soils. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) in Tübingen. Tagungsband, BioSpektrum. Abstract, SMV008.

### Poster

**Stacheter, A.**, Hetz, S., Ebertsch, L., Glowik-Appelt, B., Drake, H. L., Kolb, S. (2011) Methylotroph diversity in grassland and forest soils as revealed by cultivation and pyrosequencing of structural genes. „Ecology of Soil Microorganisms“ in Prag, CZ. Tagungsband, S. 210.

**Stacheter, A.**, Hetz, S., Ebertsch, L., Glowik-Appelt, B., Drake, H. L., Kolb, S. (2011) *Alphaproteobacteria* are prevalent methylotrophs in aerated soils as determined by cultivation and pyrosequencing of structural genes. Jahrestagung der VAAM in Karlsruhe. Tagungsband, BioSpektrum. Abstract, EMP064.

**Stacheter, A.**, Glowik-Appelt, B., Ebertsch, L., Thamm, C., Drake, H. L., Kolb, S. (2010) Aerobic methanol-utilizing bacteria in aerated soils are neutrophilic. Jahrestagung der VAAM in Hannover. Tagungsband, BioSpektrum. Abstract, BDP27.



## **Weiterer Tagungsbeitrag**

**Stacheter, A.**, Kolb, S., Drake, H. L. (2011) Microbial degradation of methanol in two grassland soils: a proof of principle. Posterpräsentation auf der „Gordon Research Conference“ in South Hadley, Massachusetts, US.

## **Poster über frühere Arbeiten**

**Stacheter, A.**, Jahn, U., Mayer, F., Stieglmeier, M., Rachel, R., Thomm, M., Huber, H. (2008) Microbial diversity of hot springs in Lesbos, Greece. Jahrestagung der VAAM in Frankfurt am Main. Tagungsband, BioSpektrum. Abstract, PN70.

## **ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Weiterhin versichere ich, dass ich bei keiner anderen Universität ein Promotionsgesuch eingereicht oder eine Dissertation begonnen habe.

Bayreuth, 03.06.2013